

Title	メディエータ型酵素バイオ電池の研究開発(Dissertation_全文)
Author(s)	酒井, 秀樹
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2014-05-23
URL	http://dx.doi.org/10.14989/doctor.r12833
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

メディエータ型酵素バイオ電池の 研究開発

酒井 秀樹

2014 年

目次

略語表	2
緒言	4
第 1 章	酵素固定化電極及び電解液の基本設計6
	要旨6
	緒言6
	実験方法9
	結果及び考察15
	結論27
	参考文献28
第 2 章	負極用電子メディエータの設計30
	要旨30
	緒言30
	実験方法31
	結果及び考察34
	結論38
	参考文献38
第 3 章	電解液の再設計39
	要旨39
	緒言39
	実験方法41
	結果及び考察43
	結論46
	参考文献47
第 4 章	容量向上を目指した glucose 代謝系の検討48
	要旨48
	緒言49
	実験方法51
	結果及び考察52
	結論57
	参考文献58
第 5 章	積層型シート状電極の構築59
	要旨59
	緒言60
	実験方法62
	結果及び考察64
	結論70
	参考文献71
結言	73
謝辞	74
発表論文	75

略語表

ABTS	:2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
ACNQ	:2-Amino-3-carboxy-1,4-naphthoquinone
ANQ	:2-Amino-1,4-naphthoquinone
AQ2S	:Anthraquinone-2-sulfonic acid
BFC	:Biofuel cell
BET	:Brunauer,Emmet and Teller
BOD	:Bilirubin oxidase
CA	:Chronoamperometry
CE/MS	:Capillary electrophoresis/mass spectrometry
CF	:Carbon fiber
CV	:Cyclic voltammetry
C.E.	:C.E.
CMC	:Carboxymethylcellulose
CP	:Carbon paper
DET	:Directed electron transfer
DI	:Diaphorase
DMFC	:Direct methanol fuel cell
F6P	:Fructose-6-phosphate
GA	:Glutaraldehyde
GAP	:Glyceraldehyde-3-phosphate
GC	:Glassy carbon
G6P	:Glucose-6-phosphate
GDH	:Glucose dehydrogenase
Gn5DH	:Gluconate-5-dehydrogenase
HPC	:Hierarchical porous carbon
IBS	:Imidazole/HCl buffer solution
KB	:Ketjenblack
LFER	:Linear Free Energy Relationship
LSV	:Linear sweep voltammetry
MET	:Mediated electron transfer
NADH	: β -Nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	: β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
OA-cell	:Open-air type cell
PAANa	:Polyacrylic acid sodium
PBS	: Phosphate buffer solution
PIC	:Polyion complex
PLL	:Poly-L-lysine

PP	:Pentose phosphate
PTFE	:Polytetrafluoroethylene
R.E.	:Reference electrode
Ru5P	:Ribulose-5-phosphate
S-cell	:Sink-type cell
S7P	:Sedoheptulose-7-phosphate
TCA	:Tricarboxylic acid cycle
VGCF	:Vapor-grown carbon fiber
VK ₃	:2-Methyl-1,4-naphthoquinone , vitamin K ₃
W.E.	:Working electrode

緒言

現在、世界的に利用が拡大している、スマートフォン等のモバイル機器、及びエンジンとのハイブリット型を含む電気自動車を扱うユーザーのエネルギーデバイスに対する要求の 1 つに、長時間駆動、つまり電池の高容量化がある。そのために、現行のリチウムイオン電池の高容量化の技術開発や、燃料電池を含むポストリチウムイオン電池の研究開発が精力的に行われている。高容量化を目指す一方で、一般的にトレードオフの関係にある電池の安全性に関わる研究開発も重要である。また昨今、特に新興国での著しい人口増大及び経済発展により、資源・エネルギー問題が地球規模で拡大している。この問題に対する将来に亘る有効な解決方法として、太陽光に由来する再生可能エネルギー・材料の利用が提案されている。

バイオ電池 (biofuel cell, BFC) は、生体内のエネルギー変換システムを模倣し、生体触媒である酵素を利用して、glucose 等から電気エネルギーを取り出す次世代エネルギー変換デバイスである。BFC は生体親和性が高く、高い理論エネルギー容量密度を有する身近な物質から発電できるため、安全・クリーン・充電フリー・高容量な電池として期待されている¹。また一般的な燃料電池と比較して、利用する燃料や触媒の観点から、安全性、低コストの面で優れている。

BFC は一般的に、生体触媒として単離酵素を用いる酵素型²と、微生物をそのまま用いる微生物型³の 2 つに大きく分類される。さらに、生体触媒と電極との間で、電子メディエータが関与するメディエータ (MET) 型と、直接電子が移動する直接電子移動 (DET) 型とに分別される。酵素 BFC はある程度の出力が期待できるため、小型電子機器用の電源として期待され、微生物 BFC は多種の炭水化物等を燃料として使用可能であるため、廃棄物処理・発電として、最初の応用が期待されている。ただし、本研究を開始した時点では「出力」、「容量」、「耐久性」といった電池性能全般で実用化への課題が多かった。

そこで本研究では、グローバルな課題を解決し社会に貢献することを最終目的として、小型電子機器向けの glucose を燃料とした MET 型酵素 BFC の実用化を目標にした。Figure 1 に示す電池の構成で、上記、電池特性の課題の中で、特に「出力」、「容量」に関する課題を解決するための研究開発を行った。

出力に関する研究では、物質輸送に優れる酵素固定化電極及び電解液を設計する (第 1 章、第 3 章) とともに、過電圧を低減する電子メディエータを設計する (第 2 章) ことで、駆動電圧と触媒電流の向上を両立させた高出力な電池系を実現した。

容量に関する研究では、glucose 燃料の代謝系を in vitro で再構成することで、完全酸化による高容量酵素バイオ電池の実現の可能性を示す (第 4 章) とともに、電池試作品において、電池構造・材料を再設計することで、燃料交換可能で長時間駆動する高容量な電池系を実現した (第 5 章)。

(参考文献)

1. K. Kano (supervising editor), *Recent Progress in Biofuel Cells*, CMC Publishing (2011). [in Japanese]
2. Y. Kamitaka, S. Tsujimura, N. Setoyama, T. Kajino, and K. Kano, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **9**, 1793 (2007).
3. K. Watanabe, M. Miyahara, T. Shimoyama, and K. Hashimoto, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **92** (6), 1307 (2011).

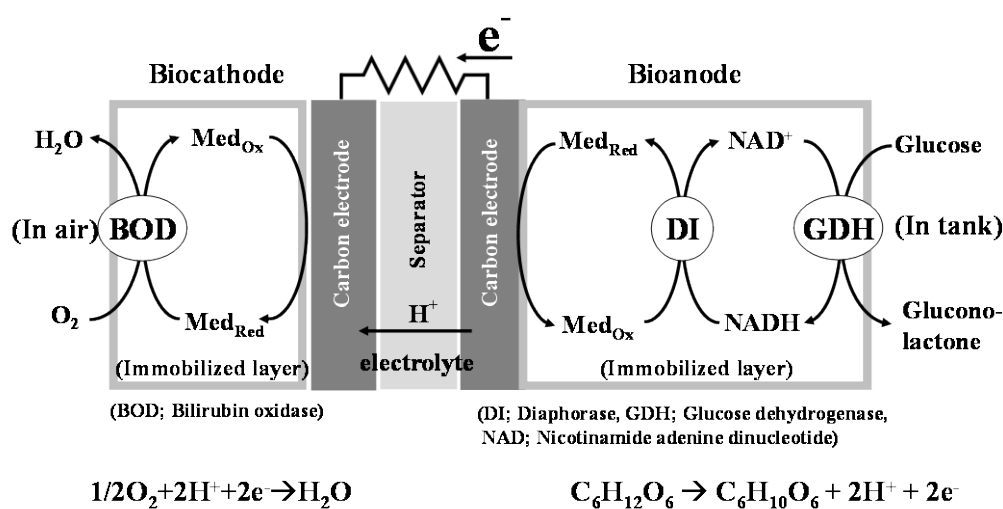


Figure 1 Structure of the mediated-electron-transfer type enzymatic biofuel cell

第 1 章 酵素固定化電極及び電解液の基本設計

要旨

酵素を固定化する電極基板として、高表面積かつ物質輸送に優れる炭素繊維のシート状電極(厚さ 750 μm)を 2-4 枚重ねて用い(厚膜状電極)、その炭素繊維(直径 7 μm)の表面上に、正負の異なる電荷を持つ 2 種のポリマーの静電相互作用を利用して、酵素を電子メディエータと共に高密度に安定に固定化した。

特に正極においては、大気中の酸素を電極内に効率的に取り込める空気拡散型正極(大気暴露型正極)を設計し、正負極間にセロハンセパレータを配置して正極内の水分制御を行うことで、従来の正極(浸水型正極)と比較して、大きな還元触媒電流密度を得ることに成功した。これは正極の酵素固定化電極表面上への、大気中からの酸素供給が大幅に向上したことを示唆している。

同時に、燃料を含む電解液(0.4 M glucose, pH 7.0)に含まれるリン酸緩衝物質の濃度を最適化した結果、1 M まで高濃度にすることで、正負極とも電流密度が最大値となった。これは高濃度の緩衝物質により電極近傍でのプロトンの授受速度が向上し、大電流(高速酵素反応)に伴う pH 変化が抑制されたためと推測した。これらの要素技術を導入し、当時(2007 年)、世界で初めてパッシブ条件での電池評価において、投影電極面積当りの出力密度(面積出力密度)で最大 1.5 mW cm^{-2} at 0.3 V を達成した。

緒言

バイオ電池は、室温、中性のマイルドな条件下で、触媒として酵素や微生物を用いて、糖や有機酸のような再生可能エネルギーを酸化する過程と、酸素を還元する過程を同時に起こすことで、電気エネルギーを生成する¹⁻¹⁴。また、リチウムイオン電池やダイレクトメタノール形燃料電池のような原稿のエネルギーデバイスと比較して、高い容量密度と高い安全性を有する次世代のエネルギーデバイスとして期待されている。医療機器用の埋め込み可能なエネルギーデバイスとして提案されている小型バイオ電池^{1,10}の面積出力密度は、機械的な攪拌やポンプのような燃料及び酸素の対流システムを用いても、数 mW cm^{-2} のオーダー内であり、結果としてバイオ電池 1 セルあたりで数 μW となってしまう。対流システムがない場合の出力密度は、数オーダーで著しく減少する。これは、燃料と酸素の物質移動の限界と電極上のバイオ電気化学触媒の固定化層内の透過障壁¹⁶のためである。

ポータブル電子機器に求められる出力は少なくとも 100 mW である。この出力は、例えば、メモリー型 Walkman (Sony, NW-E407)を十分に動作可能な値である。このような高出力を実現するために、電極と酵素間を電子メディエータが媒介するメディエータ電子移動(MET)型酵素バイオ電池を検討した(Figure 1)。このシステムは、直接電子移動(DET)型のシステムや微生物を

用いたシステム^{6,12,13}と比較して、メディエータ濃度を十分に高くすれば、面積電流密度を高くできるメリットがある。また、十分な酸素供給システムを有する正極構造の設計もしなければならない。それは、電解液中では酸素濃度が非常に小さく、正極での電流密度が小さくなってしまいうからである²⁹。さらに、バイオ電池単セル (Figure 2) 当りで、 mW cm^{-2} の面積出力密度を示すだけではなく、複数のセルから構成される積層型電池ユニット (Figure 3) も構築しなければならない。

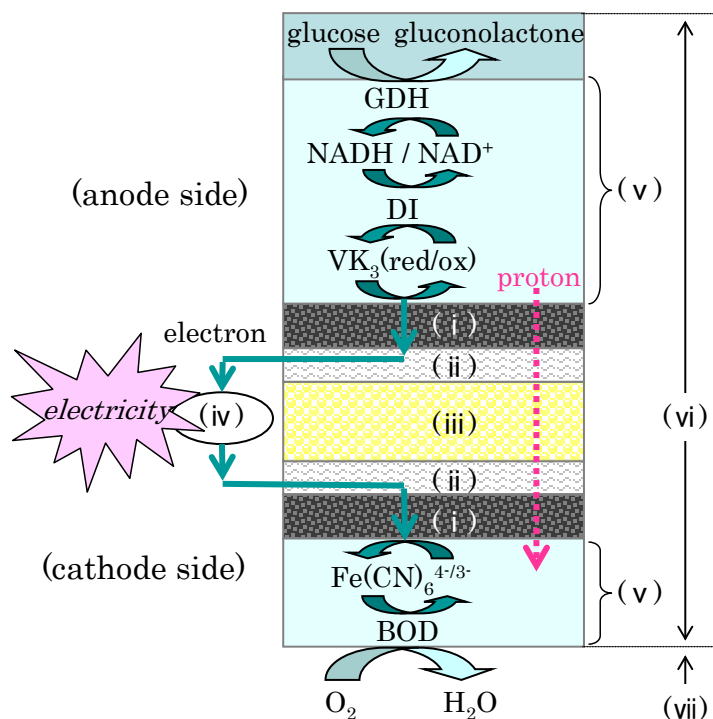


Figure 1 Reaction scheme of the biofuel cell. (i) carbon-fiber electrode, (ii) Ti-mesh collector, (iii) cellophane separator, (iv) external circuit, (v) enzyme/mediator immobilized layer, (vi) electrolyte solution including the phosphate buffer, (vii) air.

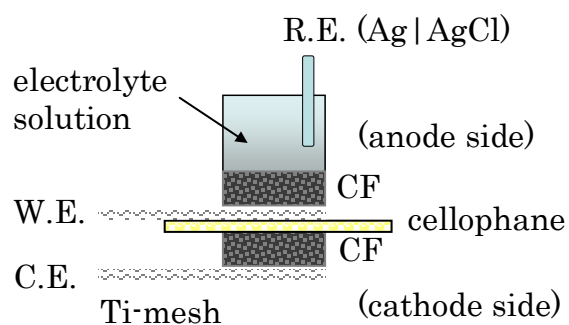


Figure 2 Schematic structure of an electrochemical cell for the single biofuel cell with a solution volume of 3 ml.

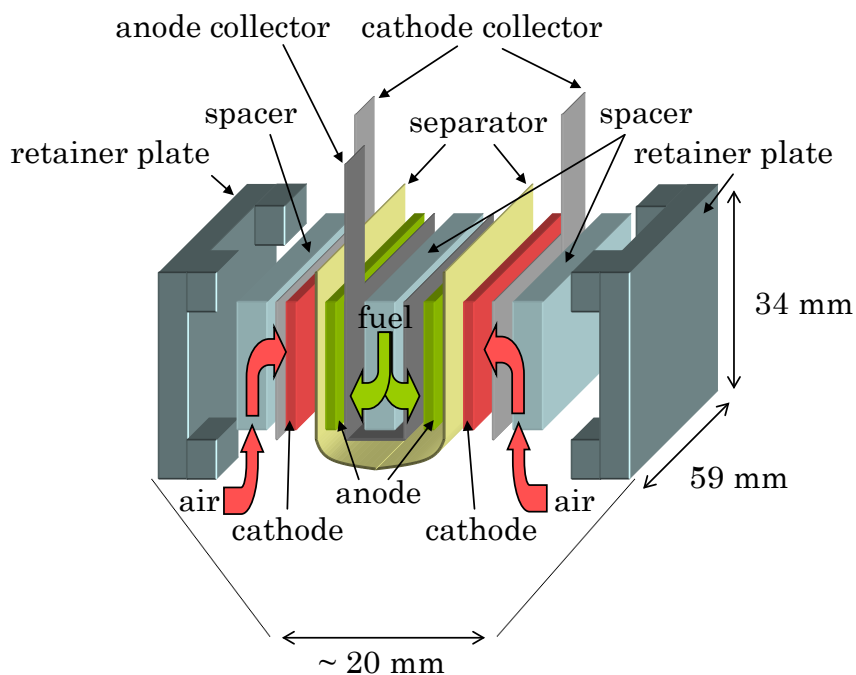


Figure 3 Schematic view of a multi-stacked biofuel cell unit composed of two biofuel cells (Figure 2) connected in parallel.

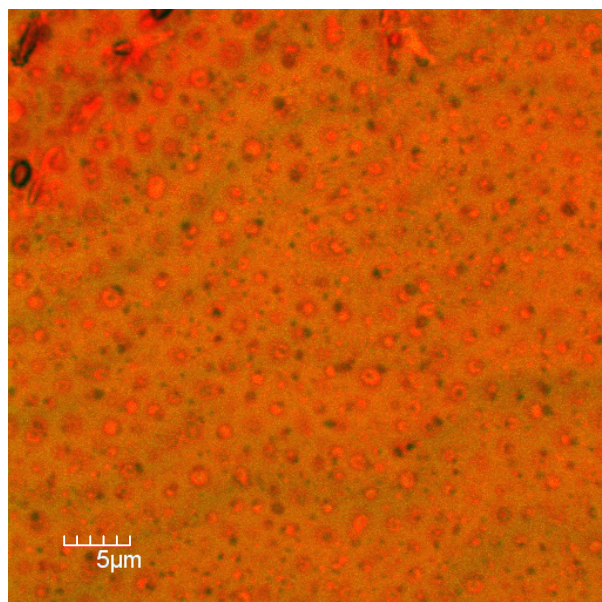
実験方法

試薬

Glucose dehydrogenase (GDH, EC 1.1.1.47) from *Bacillus sp.*、diaphorase (DI, EC.1.6.99.-) from *Bacillus stearothermophilus*、bilirubin oxidase (BOD, EC 1.3.3.5) from *Myrothecium verucaria*. は、天野エンザイム株式会社から購入し、精製なしに実験に用いた。β-Nicotinamide adenine dinucleotide disodium salt (reduced form) (NADH)、poly-L-lysine (PLL, Mw = ca. 93,800)、polyacrylic acid sodium salt (PAAcNa, Mw = ca. 30,000) は、シグマアルドリッチ株式会社から購入した。2-Methyl-1,4-naphthoquinone (vitamin K₃, VK₃) は、ナカライテスク株式会社から購入した。K₃[Fe(CN)₆]、glutaraldehyde (GA) は、和光純薬工業株式会社から購入した。Poly-L-lysine (PLL, Mw = ca 8,000 and 513,000) は、株式会社ペプチド研究所より購入した。3-mm φ のグラッシーカーボン (GC) 平板は、ビー・エー・エス株式会社で購入した。カーボンファイバー (CF) シート (BO050, 厚さ 750-μm) は東レ株式会社から購入し、10 mm 角に切り抜いて、負極及び正極として用いた。CF シートの BET 比表面積は、200 °C で 2 時間排気後、Belsorp-Max equipment (BEL Japan Inc., Japan) を用いて、77 K での窒素脱吸着等温線分析によって、0.17 m² g⁻¹ と見積られた。負極用の 4 枚重ねの 10 mm 角 CF シートの総比表面積は、20.4 cm² と見積られた。CF シート上への固定化層の吸着性を向上させるために、酵素とメディエータを固定化する前に、UV. TC. 110 (BIOFORCE Nanosciences. Inc.) を用いて、CF シートのオゾン処理を行った。セロハン膜はフタムラ化学株式会社から購入し、セパレータとして用いた。Ti メッシュは株式会社サンクメタルから購入した。

GC バイオ負極の作製

GC 電極上に、PLL 水溶液 (2 % (w/v)) を 10 μl、GDH 水溶液 (1 U/μl in a 0.1 M PBS (pH 7.0)) を 8 μl、DI 水溶液 (10 U/μl in the PBS) を 8 μl、NADH 水溶液 (0.9 μmol/μl in the PBS) を 2 μl、VK₃ 溶液 (0.29 M in acetone) を 4 μl、PAAcNa 水溶液 (0.066 % (w/v)) を 4 μl、この順で滴下した。各滴下のステップ後に 40 °C で 10 min の乾燥を行った。修飾電極は、電気化学測定前に、5 min 間純水で洗浄した。固定化層の厚みは、共焦点顕微鏡 (FV1000-BX6, Olympus Co., Japan) を用いて見積った。乾燥状態で 53 μm の厚さであった (Supplementary Figure 1)。



Supplementary Figure 1 Confocal microscopic image of a GC-bioanode before electrochemical measurement. Orange color corresponds to the fluorescence of VK₃. Crater-like structures seem to be generated during the drying process. The thickness of the layer was evaluated from difference of the focal points between the top layer and the surface of the GC-electrode.

CF バイオ負極の作製

GC バイオ負極の作製の場合と同様に、CF バイオ負極を作製した。固定化プロセスにおいて、乾燥条件は変更せずに、4 枚重ねの CF シート上に、GC バイオ負極の作製の場合の各溶液量を 14 倍にして、CF バイオ負極を作製した。電気化学測定前の CF バイオ負極の厚みは、クーラントプルーフマイクロメータ (Series No. 293, Mitutoyo Corporation, Japan)を用いて、圧力条件 26.5 N cm^{-2} で測定した結果、 2.11 mm であった。

CF バイオ正極の作製

2 枚重ねた CF シート上に、 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 水溶液 (0.1 M) を $80 \mu\text{l}$ 、PLL 水溶液 (1% (w/v)) を $80 \mu\text{l}$ 、BOD 水溶液 (50 mg/ml in a 50 mM PBS ($\text{pH } 7.0$)) を $80 \mu\text{l}$ 、この順で滴下した。それぞれの溶液の滴下後、 30°C で 10 min の乾燥を行った。CF バイオ正極の厚みは、CF バイオ負極と同様に測定した結果、 0.905 mm であった。

バイオ負極とバイオ正極の電気化学測定

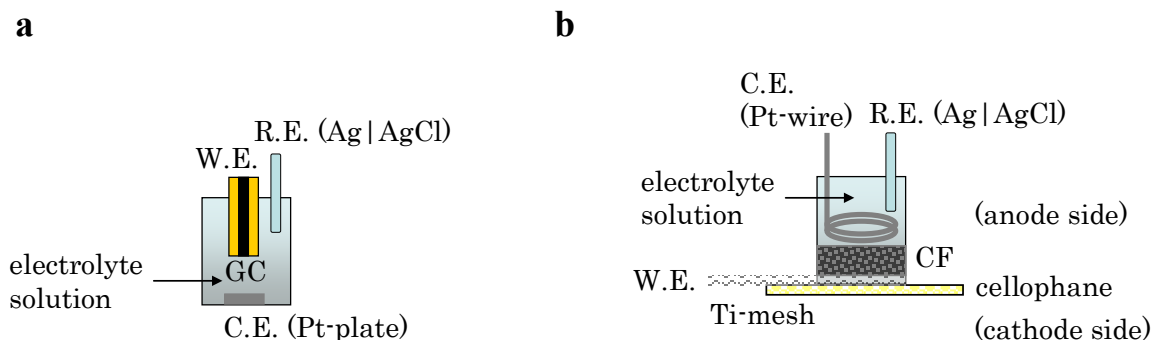
Cyclic voltammetry (CV)、chronoamperometry (CA)は、1480 Multi-Stat (Solartron Analytical)を用いて、室温で強制的な対流を加えずに 3 電極式で測定した。GC バイオ負極、CF バイオ負極、CF バイオ正極を作用極、Pt 線を対極に、 $\text{Ag}|\text{AgCl}$ (sat. KCl)電極を参照電極とした。

GC バイオ負極は、通常の一つの反応槽を有するセル (Supplementary Figure 2a)を用いて評価した。測定溶液は、glucose 濃度が 0 から 0.4 M まであって、 0.05 から 2.0 M の PBS ($\text{pH } 7.0$)を用いた。溶液中の酸素は、測定前に水蒸気飽和した Ar ガスでバブリングすることにより取り除いた。

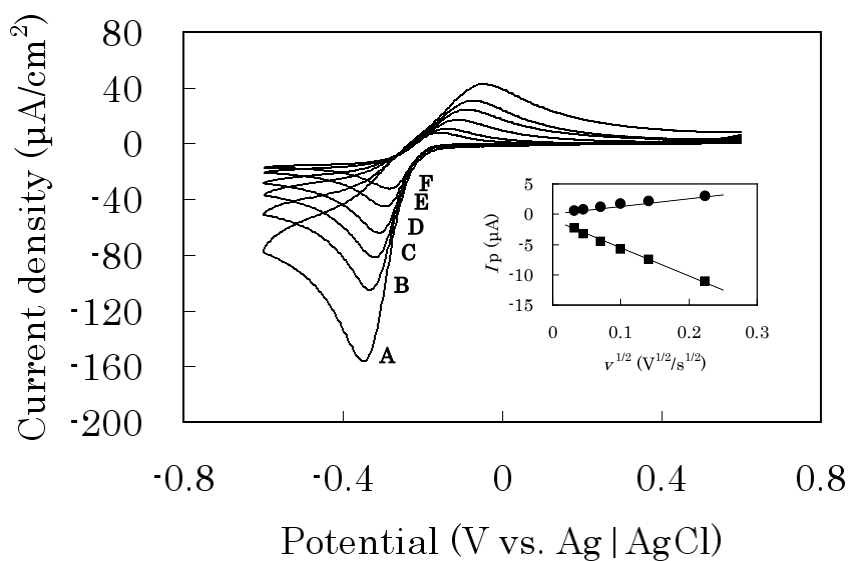
GC バイオ負極の共焦点顕微鏡像 (Supplementary Figure 1)から、多量の VK_3 が均一に固定化されていることが分かる。Glucose が不在条件下での酸化還元波は、GC バイオ負極上に捕捉されている VK_3 の酸化還元反応に起因できる (Supplementary Figure 3)。スキャンレート (v)の平方根に対して電流ピークが直線性を示すことから (inset in Supplementary Figure 3)、 VK_3 は固定化層内 (乾燥状態で $53 \mu\text{m}$ の厚み)で拡散していることが示される。固定化層内の VK_3 の濃度は、還元体 VK_3 の酸化から計算されるファラデー電気量 (2.8 mC cm^{-2})から、 2.8 mM と求められた。

CF バイオ負極を作用極とするときは、電気化学セルの底にセットし、CF 電極と電気的接触のために Ti メッシュを集電体として用いた (Supplementary Figure 2b)。

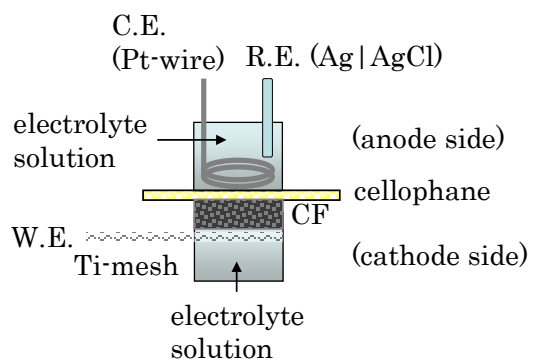
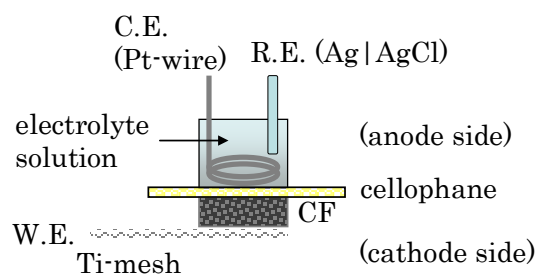
CF バイオ正極中への酸素の物質移動の効率を評価するために、2 種類の電気化学セルを構築した。両セル中とも、セロハン膜と Ti メッシュの間に CF バイオ正極を挟んだ。一方は、浸水型セル (sink-type cell, S-cell, Supplementary Figure 5a)である。このセルでは、挟まれた CF バイオ正極が電解液中に沈んでおり、電解液を介して、酸素が CF バイオ正極に供給される。もう一方は、大気暴露型セル(open-air type cell, OA-cell, Supplementary Figure 5b)である。このセルでは、挟まれた CF バイオ正極が電気化学セルの底を構成しており、空気に暴露している。従って、酸素が空気から Ti メッシュを介して CF バイオ正極中へ拡散できる。



Supplementary Figure 2 Schematic structure of the electrochemical cells for (a) GC-bioanode and (b) CF-bioanode. The volume of the solution is 1 ml for cell (a) and 3 ml for cell (b).



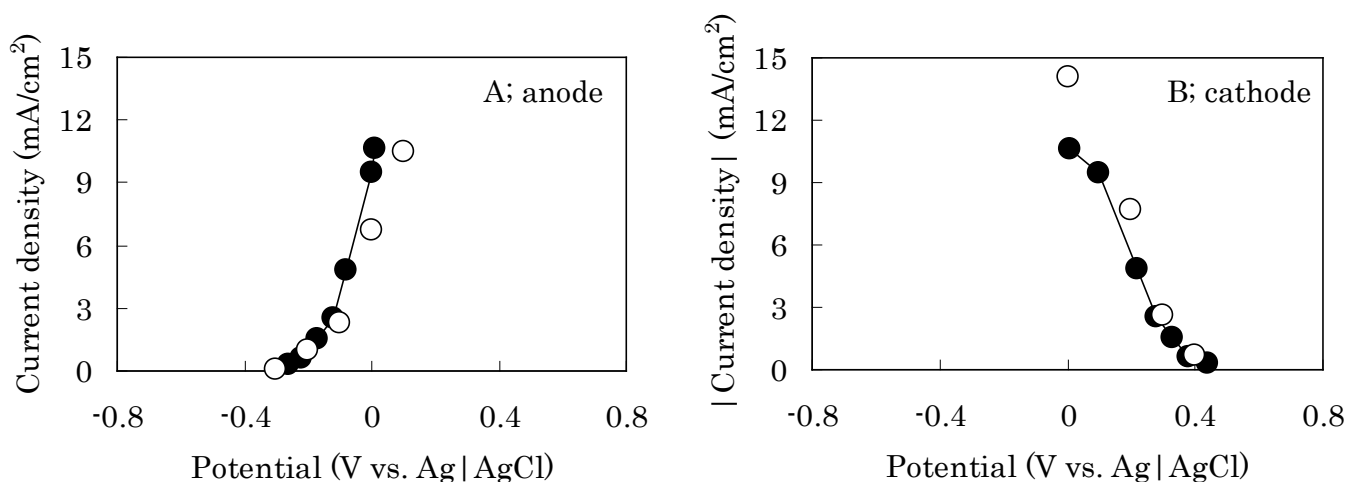
Supplementary Figure 3 Voltammetric characterization of the GC-bioanode in the absence of glucose, using the electrochemical cell (Supplementary Figure 2a). CV on a GC-bioanode at scan rate (ν) of (A) 50, (B) 20, (C) 10, (D) 5, (E) 2, and (F) 1 mV/s (pH 7.0) are shown here. The inset shows the linear dependence of the peak current (I_p) on the square root of the scan rate (ν). The peak separation was 126 mV at $\nu = 1$ mV/s, which suggests a quasi-reversible electron transfer of VK_3 within the immobilized layer.

a**b**

Supplementary Figure 5 Schematic structures of electrochemical cells for CF-biocathodes in (a) sink-type cell (S-cell) and (b) open-air type cell (OA-cell). The solution volume of cell (a) is 3 ml for the anode side and 2 ml for the cathode side, and that of the cell (b) is 3 ml for the anode side. The internal resistance of the cells exiting the cellophane between W.E. and R.E. is $1.7 \Omega/\text{cm}^2$.

バイオ電池の電気化学測定

CF バイオ負極と CF バイオ正極との間にセロハン膜を挟んだ、パッシブ型バイオ電池 (Figure 2) を構築した。バイオ電池の評価用の燃料溶液は、0.4 M glucose を含む 1.0 M PBS (pH 7.0) とした。CF バイオ負極、及び CF バイオ正極の面積電流密度 (opened circle in Supplementary Figure 11) は、それぞれ CF バイオ負極用 (Supplementary Figure 2b)、及び CF バイオ正極用 (OA-cell, Supplementary Figure 5b) の電気化学セルを用いて評価した (Supplementary Figure 11)。さらに、バイオ電池単セル (Figure 2) の 2 つが並列に連結された、積層構造を有するパッシブ型バイオ電池ユニット (Figure 3) を作製した。30 × 55 mm の長方形にカットされた CF シートを電池ユニットの電極として用いた。袋状のセロハン膜は、空気からの酸素の物質移動が速い CF バイオ正極への溶液供給を制御するためと、バイオ負極と燃料溶液を保持するためとに用いた。また燃料と酸素が透過できる多数の穴を有するスペーサーとバイオ電池を固定するための固定板を使用した。



Supplementary Figure 11 The current-potential relationship of the biofuel cell under power-generation(●) using the electrochemical cell for the biofuel cell (Figure 2), compared with those of two electrochemical cells (○) using the CF-bioanode (Supplementary Figure 2b) and the CF-biocathode (OA-cell, Supplementary Figure 5b). All data were taken after 1-min CA in a 0.4 M glucose/1.0 M phosphate buffer solution (pH 7.0) under quiescent conditions.

バイオ負極とバイオ正極の他の測定

CA 後の CF バイオ負極と CF バイオ正極中の溶液の pH は、平面構造を有する pH メータ (TYPE PCE308S-SR, Toko Chemical Laboratory Ltd., Japan) を用いて測定した。CA 後の CF バイオ正極中の水分量は、カールフィッシャー法と湿度メータ (CA-200, Mitsubishi Chemical Co., Japan) を用いて測定した。

結果及び考察

以下で、主要な 3 つの技術；1) 負極上への酵素/電子メディエータの固定化方法、2) 緩衝物質を含む電解液、3) 正極の電極構造、を導入することで、電子機器を十分に動作可能な出力を示した、積層構造を有するパッシブ型バイオ電池ユニット (Figure 4)の作製について記述する。

Glucose の 2 電子酸化を触媒する NAD 依存型 glucose dehydrogenase (GDH, EC 1.1.1.47) (Figure 1)に注目した。電極上において NADH の直接電気化学的な酸化には大きな過電圧があるので¹⁸、効率的に NADH を酸化するバイオ電気化学触媒である、diaphorase (DI, EC 1.6.99.-)を用いた。2-Methyl-1,4-naphthoquinone (VK₃)は、還元体 DI から電極への電子メディエータとして使った。その理由は、VK₃ が、速い反応速度と小さい熱力学的ロスの観点で、DI が触媒する NADH 酸化反応システムに対して、有望なメディエータであるからである^{11,17}。投影電極面積当りで十分な触媒電流密度を得るために、GDH, NADH, DI, VK₃ の 4 つの成分を、それらの生化学的、電気化学的活性を低下させないまま、電極上に高濃度に捕捉する必要がある⁴。そのために、polyanion の polyacrylic acid と polycation の poly-L-lysine (PLL)との間に働く静電相互作用を用いて、glassy carbon (GC)板上に 4 つの成分を固定化する、ポリイオンコンプレックス (PIC)法^{19,20}を採用した。これを GC バイオ負極とした。

Glucose の非存在下で、GC バイオ負極の cyclic voltammetry (CV)は、0.1 M phosphate buffer solution (PBS, pH 7.0)中で、-0.17 V vs. Ag|AgCl の中間電位を示す VK₃ の酸化波と還元波とを示した (wave A in Figure 5)。Glucose の存在下では、glucose の触媒的酸化波が観測され (waves B-G in Figure 5)、その電流は glucose 濃度の増大と共に増大した。Glucose 濃度が 20 mM 以上で、GC バイオ負極は、glucose が 0.4 M のときに最大で面積電流密度 0.7 mA cm^{-2} を示した (inset in Figure 5)。このときの反応速度は酵素反応によって律速されていると推測される¹¹。この酸化波の形は、複数の電圧スキャンの間でも変化しなかった。このことから、酵素活性を維持したまま固定化層内で 4 つの成分は安定に高濃度に存在していると示唆された。

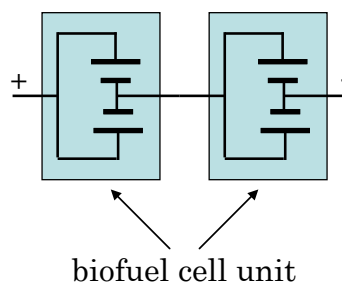


Figure 4 Circuit diagram of biofuel cell units composed of two multi-stacked biofuel cell units (Figure 3) in series.

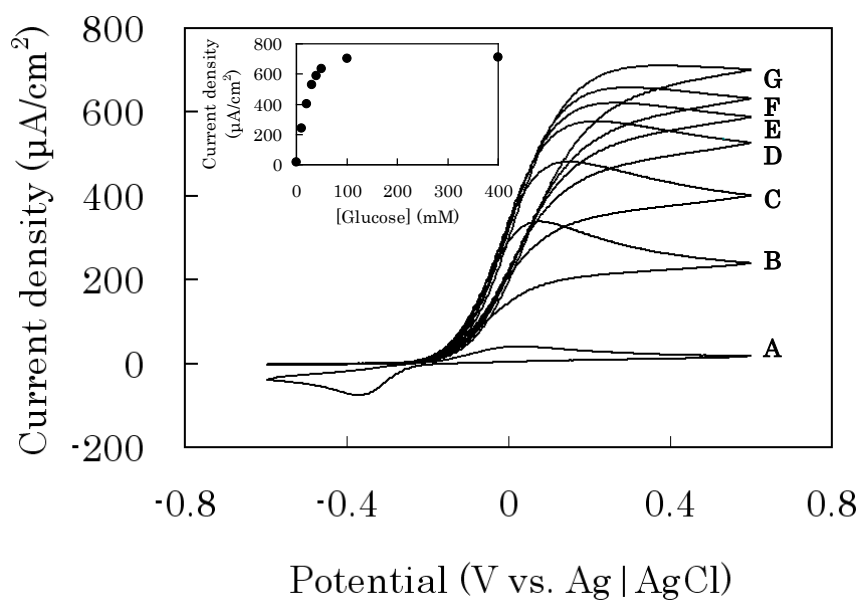


Figure 5 CV on a GC-bioanode in 0.1 M phosphate buffer solution (pH 7.0) containing (A) 0, (B) 10, (C) 20, (D) 30, (E) 40, (F) 50, and (G) 100 mM glucose. The data were taken at scan rate of 10 mV/s by using the electrochemical cell (Supplementary Fig. 2a). The inset shows the dependence of the current density at 0.6 V vs. Ag|AgCl upon glucose concentration.

さらに面積電流密度を増大させるために、GC の代わりに CF シートを用いた。その理由は、CF が glucose の移動を妨げないままに、高い比表面積と高い空隙率を有しているからである。これを CF バイオ負極とした。CF バイオ負極の電流密度は、GC バイオ負極と同じ条件下、0.1 V の CA 1 min 後で 4.1 mA cm^{-2} であった (Figure 6 の 0.1 M のときの値を参照)。CF 電極の比表面積は GC 電極の 20 倍大きいにも関わらず、その電流密度は、GC バイオ負極と比較して、たった 5.9 倍であった。この CF バイオ負極上での触媒電流密度が小さくなった理由は、CF バイオ負極内でプロトン拡散が充分ではなかったためと推測した。このため、glucose 酸化反応 ($\text{glucose} \rightarrow \text{gluconolactone} + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^-$) により固定化層内でのプロトン濃度が上昇し、GDH と DI の酵素活性の低下につながったと推定される。

この問題を解決するために、0.4 M glucose を含む電解液中の緩衝物質濃度の効果を検討した。CA 1 min 後の電流密度は、緩衝物質濃度が 1 M まで増大すると共に、増大した (Figure 6)。面積電流密度は、1.0 M PBS のとき最大で 10.5 mA cm^{-2} に達した。この値は、GC バイオ負極の 0.1 M PBS のときの値よりも 15 倍大きかった。1 M 以上に緩衝物質濃度が増大すると、電流密度は徐々に減少した。電気化学測定過程での CF バイオ負極中の pH の変化；5 min 間で 0.1 M PBS で 6.85 から 6.20 に低下、が観測された。この変化は、1.0 M で 6.85→6.62、2.0 M で 6.85→6.79 と比較してより顕著であった (Supplementary Figure 6a)。この pH 低下は、pH に依存して酵素活性が低下するために、CF バイオ負極上での電流密度の低下が引き起こされた (Supplementary Figure 7a)。以上の結果は、高濃度の緩衝物質が CF バイオ負極中の pH 低下を抑制することが可能であると明確に示すものである。

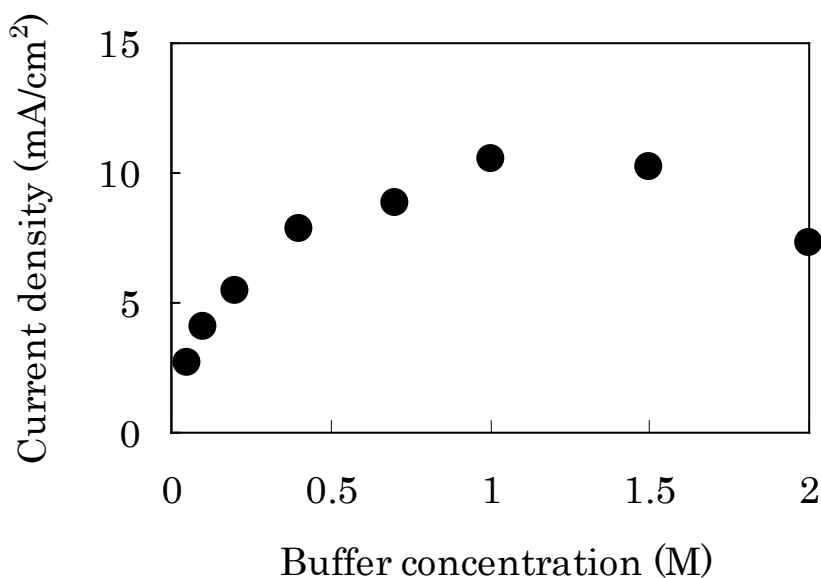
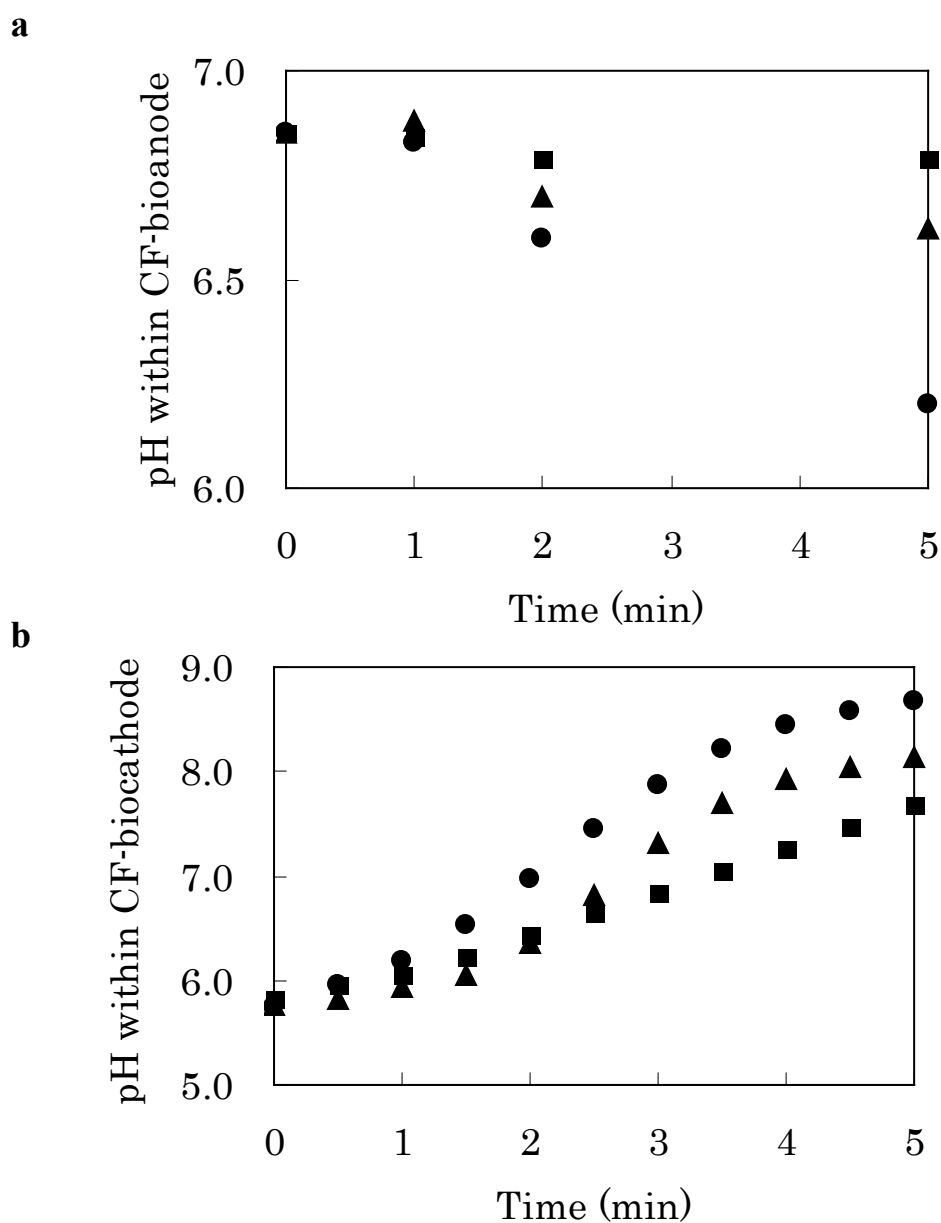
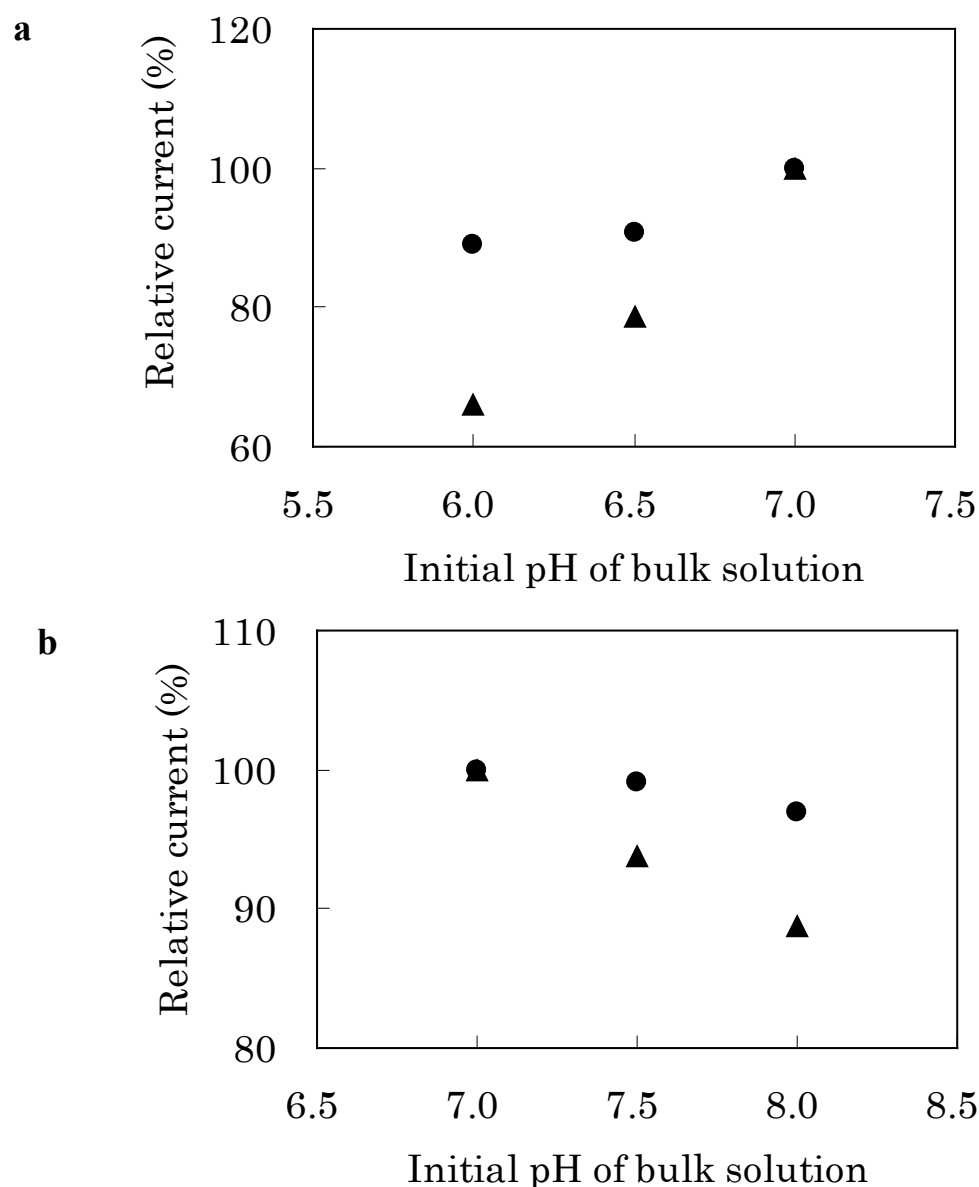


Figure 6 Plot of current density of the CF-bioanode against the buffer concentration by using the electrochemical cell (Supplementary Figure 2b). Current were recorded at 1 min in CA at 0.1 V vs. Ag|AgCl in the presence of 0.4 M glucose under quiescent conditions.

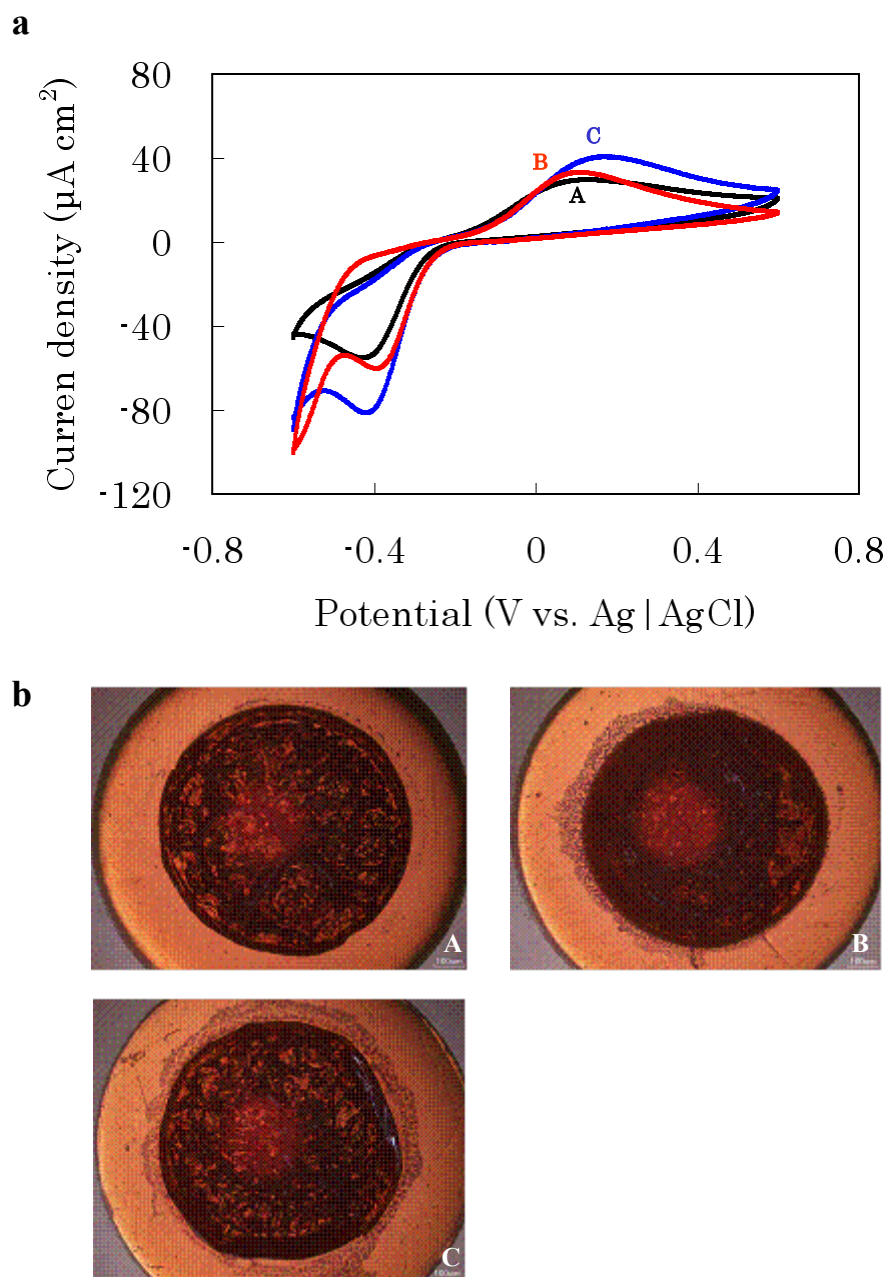


Supplementary Figure 6 The pH change within CF-electrodes during CA in 0.1 M (●), 1.0 M (▲) and 2.0 M (■) phosphate buffer solution (pH 7.0). (a) CF-bioanode during CA at 0.1 V vs. Ag|AgCl in the presence of 0.4 M glucose using the electrochemical cell (Supplementary Figure 2b). (b) CF-biocathode during CA at 0 V vs. Ag|AgCl in the absence of glucose using the OA-cell (Supplementary Figure 5b). Slight shift of pH value from 7.0 before CA would be ascribed to the components in the immobilized layer.

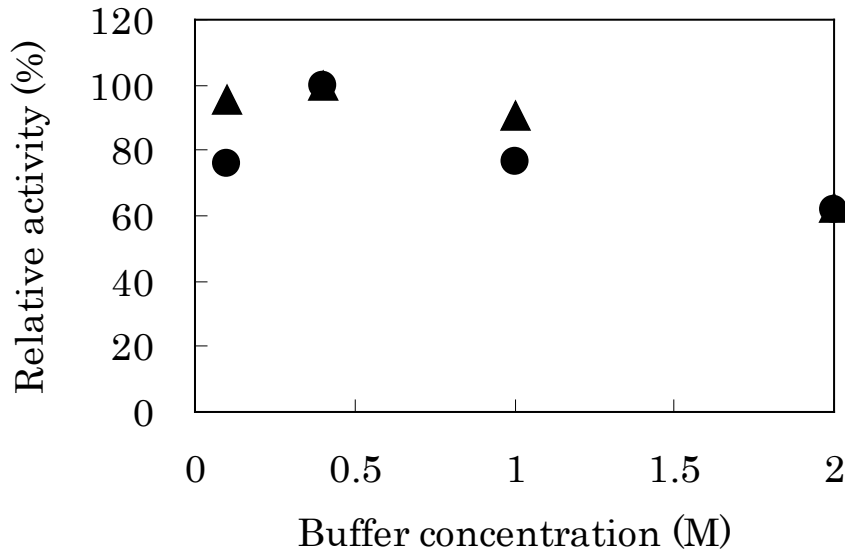


Supplementary Figure 7 The dependence of the relative current on initial pH of the provided phosphate buffer solution. The value of current at pH 7.0 was set to 100 %. (a) The relative current on a CF-bioanode after 1-min (●) and 5-min (▲) CA at 0.1 V vs. Ag|AgCl in 0.1 M phosphate buffer solution (pH 6.0, 6.5 and 7.0) containing 0.4 M glucose using the electrochemical cell (Supplementary Figure 2b). (b) The relative current on a CF-biocathode after 1-min (●) and 5-min (▲) CA at 0 V vs. Ag|AgCl in 0.1 M phosphate buffer solution (pH 7.0, 7.5 and 8.0) using the OA-cell (Supplementary Figure 5b).

一方、1.0 M から 2.0 M までの高濃度領域では、CA 1 min 後の電流密度は減少した。これは恐らく GDH と DI の溶液中の酵素活性が、0.4 M から 2.0 M までの緩衝物質濃度の増大に伴い、減少するからである (Supplementary Figure 8)。以上のように、2 つの律速段階；1.0 M 以下の緩衝物質低濃度域におけるプロトン拡散の不足と 1.0 M 以上の緩衝物質高濃度域における酵素活性の低下、が明らかになった。CF 電極上の固定化層は 2.0 M までは安定であると推定される。なぜなら、GC バイオ負極で得られたデータから、CV の緩衝物質濃度依存性がほとんどないからである (Supplementary Figure 4a, b)。



Supplementary Figure 4 Stability evaluation of the immobilized layer of a GC-bioanode for the increased buffer concentration in the absence of glucose. (a) CV on a GC-bioanode at 10 mV/s in (A) 0.1, (B) 1.0, and (C) 2.0 M phosphate buffer solution (pH 7.0), using the electrochemical cell (Supplementary Figure 2a). (b) Optical microscopic image of the enzyme/mediator-immobilized layer on the GC-electrode after CV in (A) 0.1, (B) 1.0, and (C) 2.0 M phosphate buffer solution (pH 7.0). The immobilized layer remained on the GC-electrode after CV in a high concentration buffer.



Supplementary Figure 8 The dependence of relative enzymatic activities of GDH (●) and DI (▲) on the concentration of phosphate buffer (pH 7.0). The activities of GDH and DI at buffer concentration 0.4 M are set as 100 %, respectively.

高出力なバイオ電池を構築するためには、CF バイオ負極に対応して正極も開発しなければならない。酸素の 4 電子還元有望な酵素としてのマルチ銅オキシダーゼ²¹のバイオ電気化学触媒システムは、対流条件下で酸素の拡散律速となつて、 10 mA cm^{-2} と高い還元触媒電流密度を実現できる^{15,22,23}。本論文では、マルチ銅オキシダーゼの一つである bilirubin oxidase (BOD, EC 1.3.3.5)は、中性条件下で適切なバイオ電気化学触媒として機能する²⁴。触媒電流密度を向上させるための電子メディエータとして、 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ の酸化還元体を用いた²⁵ (Figure 1)。BOD と $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ は、文献²⁵に従い、高い比表面積の CF 電極上に PLL を用いて固定化した。これを CF バイオ正極とした。

CF バイオ正極の電流密度は、浸水型セル (sink-type cell, S-cell, Supplementary Figure 5a)において、1.0 M PBS (pH 7.0)で 0 V の CA 測定中で急激に減少した (curve A in Figure 7)。このセルにおいては、酸素がバルク溶液相を介して供給される。この電流密度の急激な減少は、酸素供給の不足；水溶液中の溶存酸素の濃度及び拡散係数がそれぞれ、 0.229 mM ²⁶、 $2.07 \pm 0.66 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ ²⁷、によるものである。効率的な酸素供給システムを開発するために、空気に暴露しているバイオ正極；ポリマー電解質燃料電池や空気電池の正極構造に似た、大気暴露型セル (open-air type cell, OA-cell, Supplementary Figure 5b)を設計した。その理由は、空気中の酸素濃度 (9 mM)と拡散係数 (order of $10^{-1} \text{ cm}^2/\text{s}$)²⁸が溶液中と比較して非常に大きいからである。このセルでは、セパレータであるセロハン膜が、正極上の固定化膜中への溶液供給を制御するために、負極と正極の電解液の間にある。OA-cell の電流密度は、CA 1 min 後で 14.1 mA cm^{-2} であった (curve B in Figure 7)。一方、S-cell の電流密度はほぼゼロとなった。これらの結果から、OA-cell は酸素供給において効率的であることが示唆される。実際、OA-cell の CF バイオ正極中の水分量は、CA 1 min 後であつた 8.28 mg cm^{-2} であった (Supplementary Figure 10)。このことから、CF バイオ正極の部分的

に湿った状態が、空気から正極への酸素の物質移動の向上と固定化層中の酵素反応²⁹の効率化のために重要であると示された。

CF バイオ正極の電流密度は、緩衝物質濃度にも依存している (inset in Figure 7)。この傾向は CF バイオ負極の結果 (Figure 6) と類似している。緩衝物質濃度の最適値は、酵素、電極、固定化層、電解液の種類に本質的に依存するが、同様に 1.0 M となった。それは、CF バイオ正極においてプロトン拡散の不足と酵素の不活性との間のトレードオフの関係によって説明もできる (Supplementary Figure 6b, Supplementary Figure 7b and Supplementary Figure 9)。

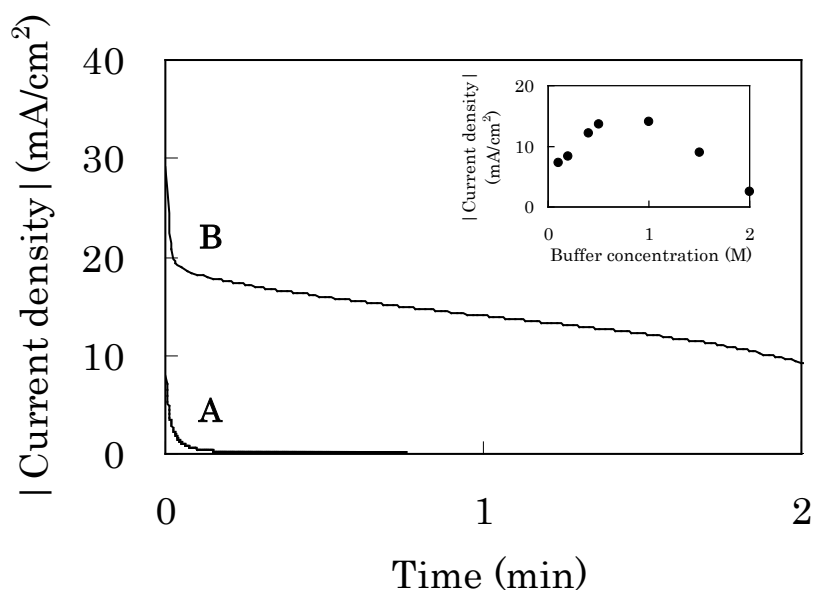
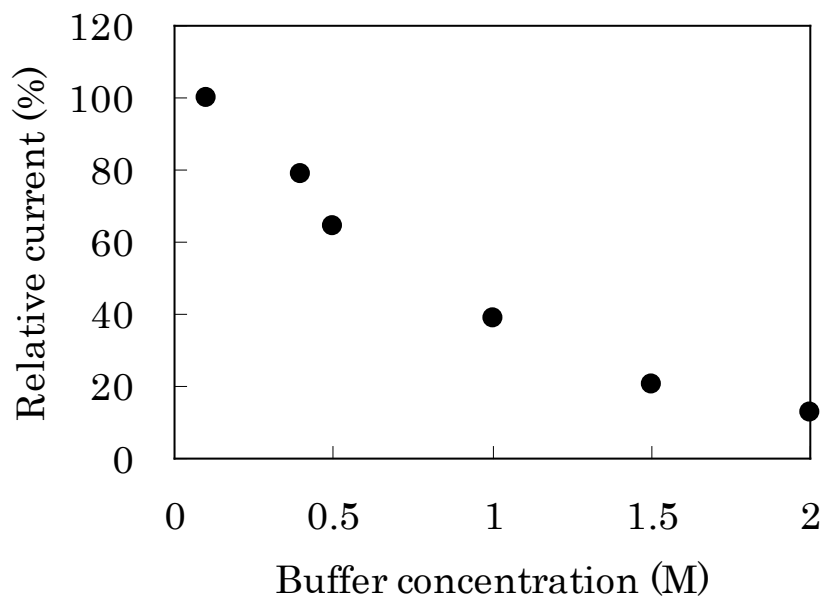
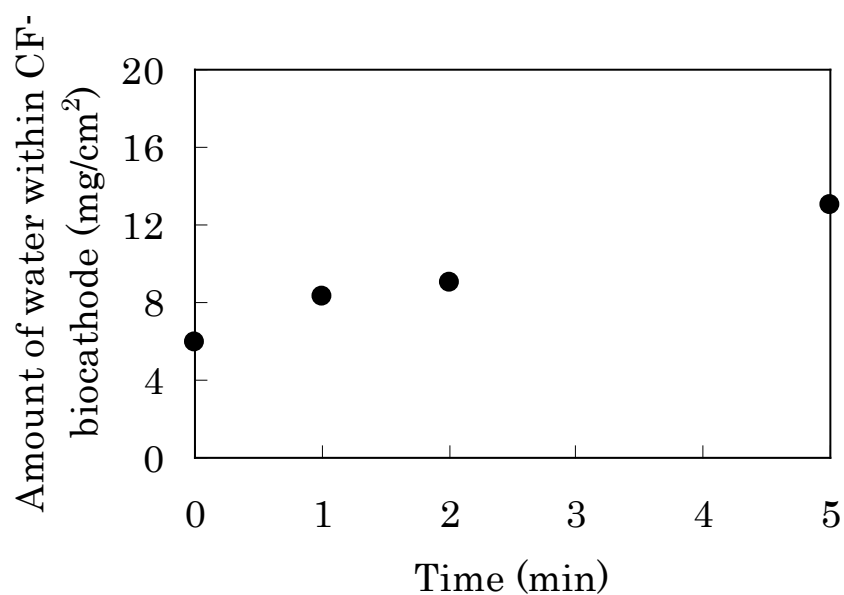


Figure 7 CA response on a CF-biocathode at 0 V vs. Ag|AgCl in 1.0 M phosphate buffer solution (pH 7.0) containing 0.4 M glucose under quiescent conditions. (A) and (B) were taken by using a sink-type cell (S-cell, Supplementary Figure 5a) and an open-air type cell (OA-cell, Supplementary Figure 5b), respectively. The inset shows the dependence of the current density after 1-min CA at 0 V upon the buffer concentration (pH 7.0) by using the OA-cell.



Supplementary Figure 9 The dependence of the relative current in cathode upon the buffer concentration. A GC-electrode was used and BOD and $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ were dissolved in phosphate buffer solution (pH 7.0).



Supplementary Figure 10 Amount of water accumulated within a CF-biocathode during CA at 0 V vs. $\text{Ag}|\text{AgCl}$ in 1.0 M phosphate buffer solution (pH 7.0) using the OA-cell (Supplementary Figure 5b).

主要な 3 つの技術を開発することで、バイオ負極とバイオ正極の両極とも、静止条件下において、 10 mA cm^{-2} 以上の面積電流密度を達成した。これらの電極で構成される、パッシブ型の glucose/ O_2 バイオ電池 (Figure 2)を構築し、 $0.4 \text{ M glucose}/1.0 \text{ M PBS (pH 7.0)}$ の燃料溶液を用いて性能を評価した。面積出力密度 (triangles in Figure 8)は、バイオ電池単セル (Figure 2)の各電圧での CA 1min 後の面積電流密度 (circles in Figure 8)から見積った。最大の出力密度は 0.3 V のとき $1.45 \pm 0.24 \text{ mW cm}^{-2}$ 、開回路電圧は 0.8 V 、短絡電流密度は 11 mA cm^{-2} 、であった。各々のセル電位で見積られた負極と正極の面積電流密度は、CF バイオ負極 (Supplementary Figure 2b)と CF バイオ正極(OA-cell, Supplementary Figure 5b)の電気化学セルで得られる値と近くなった (Supplementary Figure 11)。これは、セル抵抗による電位低下が、mA オーダーの電流の条件下においてもほとんど無視できるということを意味する。

最後に、バイオ電池 (Figure 2)の 2 つが並列に接続された積層構造を持つパッシブ型バイオ電池ユニット (Figure 3, over 50 mW , 40 cm^3)を作製した。この小型で単純な構造のセルユニットは直列や並列に互いに接続することが可能である。実際、パッシブ型バイオ電池ユニット (Figure 4, over 100 mW , 80 cm^3 , 39.7 g including 16.1 g of fuel solution)を構築し、Walkman と同様に、RC カー (16.5 g) の動作 (Supplementary Figure 12a-c)にも成功した。Walkman と RC カーは少なくとも 2 時間は動作し続けた。これらのデモンストレーションは、バイオ電池の実用化に向けた最初の一步である。

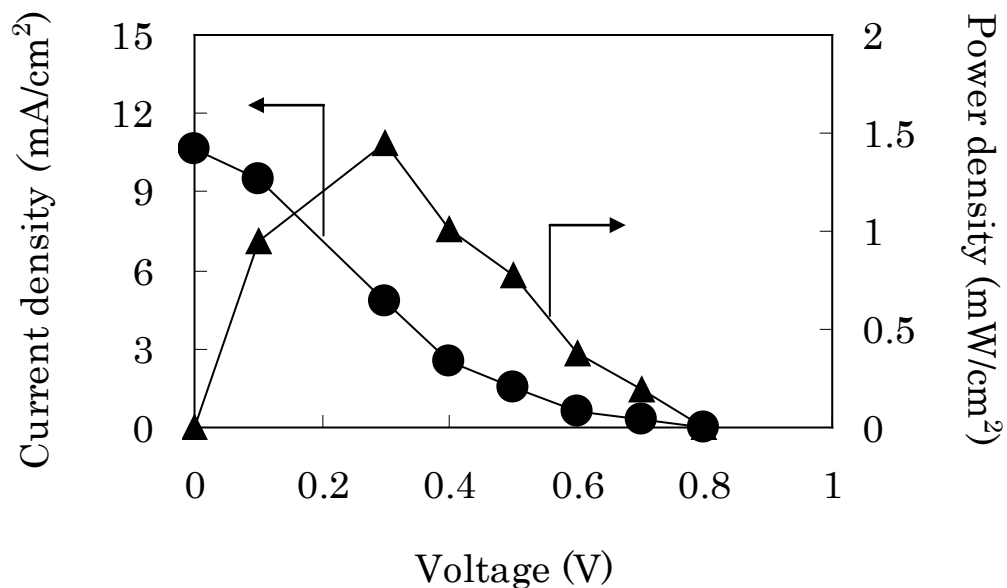
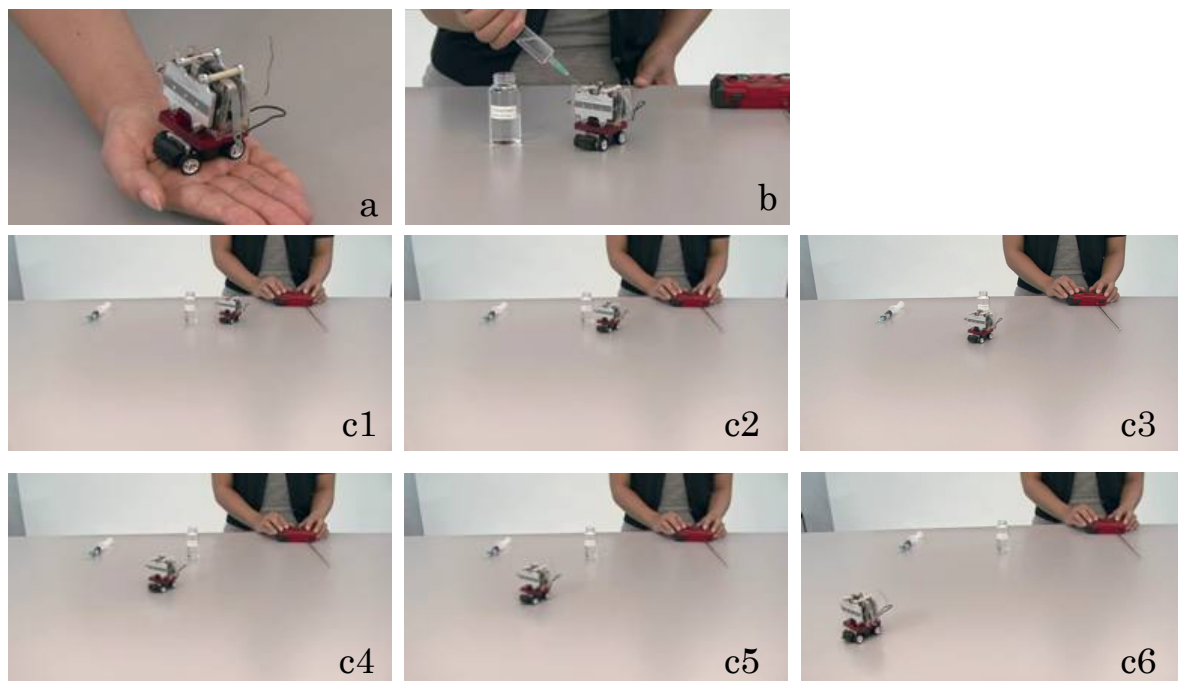


Figure 8 The performance of a passive-type biofuel cell (Figure 2) composed of the CF-bioanode and the CF-biocathode in 0.4 M glucose/1.0 M phosphate buffer solution (pH 7.0). The current density (●) was obtained after 1-min CA at each voltage of the cell, and the power density (▲) was evaluated from the current density.



Supplementary Figure 12 Demonstrative operation of a radio-controlled car by using the passive-type biofuel cell units (Figure 4) composed of two multi-stacked biofuel cell units (Figure 3). (a) A radio-controlled car with the biofuel cell units. (b) Glucose solution as fuel was injected into the cell units. (c1-6) Sequential photographs of the radio-controlled car in operation.

結論

今回のセルユニットの出力 (over 100 mW/80 cm³)は、これまで報告されている中で、対流システムを用いたものを含めても、最大のものである。提案したバイオ負極は、GDH を類似する dehydrogenases^{7,8,17}におきかえることで、幅広い燃料を利用可能である。例えば、エタノールは、alcohol dehydrogenase と acetaldehyde dehydrogenase で acetate まで酸化されると同時に、2 分子の NAD⁺を NADH に変換することができる⁸。将来、多数の酵素反応;ペントースリン酸回路や TCA 回路は糖や有機酸を CO₂ まで完全酸化することができる、が、生体模倣技術の流れの中でバイオ電池中に導入されていくだろう³⁰。もし 1 分子の glucose が 6 分子の CO₂ に完全酸化されると、24 電子が、3600 Ah kg⁻¹ に相当する電気エネルギーとして取り出すことができる。

ロボットや他のデバイスを動作させるために出力と耐久性のある実用的なバイオ電池を構築するために、固定化方法、電極構造、電解液の改善、複合酵素システムの導入、そして酵素の耐久化技術を、検討中である。

参考文献

1. A. Heller, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **6**, 209 (2004).
2. S. C. Barton, J. Gallaway, and P. Atanassov, *Chem. Rev.*, **104**, 4867 (2004).
3. G. T. R. Palmore, and G. M. Whitesides, *ACS Symp. Ser.*, **556**, 271 (1994).
4. K. Kano, and T. Ikeda, *Electrochemistry*, **71 (2)**, 86 (2003).
5. E. Katz, and I. A. Willner, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 6803 (2003).
6. Y. Kamitaka, S. Tsujimura, N. Setoyama, T. Kajino, and K. Kano, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **9 (15)**, 1793 (2007).
7. G. T. R. Palmore, H. Bertschy, S. H. Bergens, and G. M. Whitesides, *J. Electroanal. Chem.*, **443**, 155 (1998).
8. S. Topcagic, and S. D. Minter, *Electrochimica Acta*, **51**, 2168 (2007).
9. S. Tsujimura, M. Fujita, H. Tatsumi, K. Kano, and T. Ikeda, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **3**, 1331 (2001).
10. N. Mano, F. Mao, and A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 6588 (2003).
11. M. Togo, A. Takamura, T. Asai, H. Kaji, and M. Nishizawa, *Electrochimica Acta*, **52**, 4669 (2007).
12. S. K. Chaudhuri, and D. R. Lovley, *Nature Biotech.*, **21 (10)**, 1229 (2003).
13. B. E. Logan, P. Aelterman, B. Hamelers, R. Rozendal, U. Schröder, J. Keller, S. Freguia, W. Verstraete, and K. Rabaey, *Environmental Science & Technology*, **9 (3)**, 5181 (2006).
14. R. A. Bullen, T. C. Arnot, J. B. Lakeman, and F. C. Walsh, *Biosens. Bioelectron.*, **21**, 2015 (2006).
15. N. Mano, J. L. Fernandez, Y. Kim, W. Shin, A. J. Bard, and A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 15290 (2003).
16. A. Sato, K. Kano, and T. Ikeda, *Chem. Lett.*, **32**, 880 (2003).
17. K. Takagi, K. Kano, and T. Ikeda, *J. Electroanal. Chem.*, **445**, 209 (1998).
18. L. Gorton, and E. Domínguez, *Rev. Mol. Biotechnol.*, **82**, 371 (2002).
19. Y. Lvov, K. Ariga, I. Ichinose, and T. Kunitake, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 6117 (1995).
20. E. Kokufuta, *Prog. Polym. Sci.*, **17**, 647 (1992).
21. S. Shleev, J. Tkac, A. Christenson, T. Ruzgas, A. I. Yaropolov, J. W. Whittaker, L. Gorton, *Biosens. Bioelectron.*, **20**, 2517 (2005).
22. N. Mano, H.-H. Kim, Y. Zhang, and A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 6480 (2002).
23. S. Tsujimura, M. Kawaharada, T. Nakagawa, K. Kano, and T. Ikeda, *Electrochem. Commun.*, **5**, 138 (2003).
24. S. Tsujimura, H. Tatsumi, J. Ogawa, S. Shimizu, K. Kano, and T. Ikeda, *J. Electroanal. Chem.*, **496**, 69 (2001).
25. T. Nakagawa, S. Tsujimura, K. Kano, and T. Ikeda, *Chem. Lett.*, **32**, 54 (2003).
26. *Solubility Data Series, IUPAC, Pergamon Press* 7.
27. M. Tsushima, K. Tokuda, and T. Ohsaka, *Anal. Chem.*, **66**, 4551 (1994).
28. C. T. Lynch, *Handbook of Materials Science* CRC Press, **1**, (1974).
29. S. C. Barton, *Electrochimica Acta*, **50**, 2145 (2005).

30. J. Woodward, M. Orr, K. Cordray, and E. Greenbaum, *Nature*, **405**, 1014 (2000).

第2章 負極用電子メディエータの設計

要旨

MET 型 BFC の電圧は、正負極の各電子メディエータの酸化還元電位の差で決まり、負極の電子メディエータは、その酸化還元電位がより低いものが望まれる。それに加え、ジアホラーゼ (DI) との高い反応性も担保する必要がある。この触媒電流密度の対数と酸化還元電位は、拡散律速領域を除き、一般的に比例関係にある。そこで、理想的な性質を有する負極用電子メディエータを探索するために、コンピュータシミュレーションによるスクリーニングを実行した。

その結果、それまで良好とされてきた電子メディエータである 2-methyl-1,4-naphthoquinone (vitamin K₃, VK₃) に対して、2-amino-1,4-naphthoquinone (ANQ) がより高い性能を有することが示唆された。この ANQ を合成した結果、その酸化還元電位 E° は、VK₃ の $E^{\circ} = -0.22$ V (vs. Ag|AgCl, pH 7.0) より低い、 -0.36 V を示した。また、このように低い電位であるにもかかわらず、DI との触媒定数 (k_{cat}) は 620 s^{-1} と、VK₃ の 1300 s^{-1} の半分程度にとどめることができた。この ANQ を導入した酵素固定化電極を用いることで、面積出力密度を 3.0 mW cm^{-2} at 0.5 V まで向上させることができ、動作電圧も 0.3 V から 0.5 V まで増加できた。

緒言

第1章において、 1.5 mW cm^{-2} を達成したが、既存の燃料電池、例えばダイレクトメタノール型燃料電池 (DMFC) などと出力 (数 10 mW cm^{-2}) を比較するとまだまだ小さく、実用化を考えた場合、更に出力を向上させなくてはならないことは明白である。また、DMFC では開回路電圧が 0.6 V 、実用動作電圧が 0.3 V 程度であるのに対して、バイオ電池では、適当な電子メディエータを選択することにより、開回路電圧、実用動作電圧ともに上げることが可能である。実際に VK₃ を負極の電子メディエータに用いた場合では開回路電圧 0.8 V 、実用動作電圧 0.3 V であり、電圧に関しては DMFC と比較しても同等かそれ以上の性能を有している。そこで、更に出力を向上させるために、効率のよい負極用電子メディエータの探索を行った (Figure 1)。

電子メディエータは言うまでもなく、メディエータ型のバイオ電池において、大変重要な役割を果たしている³⁻⁵。負極の電子メディエータの場合、その酸化還元電位はより低く、そして触媒電流値はより高い値を示す必要がある。しかしながら、実際には拡散律速領域を除き、触媒電流値と酸化還元電位は一般的に比例関係にあることから (Linear Free Energy Relationship)⁶、この要件はトレードオフの関係にある。そこで我々は、理想的な性質を有する (より低い酸化還元電位をもちながら、高い触媒電流値を有する) 電子メディエータを探索するために、コンピュータシミュレーションによるスクリーニングを実行し、2-amino-1,4-naphthoquinone (ANQ) が高い性能を有することを発見した。以下にシミュレーション、及び ANQ を用いた酵素電極の性能について詳述する。

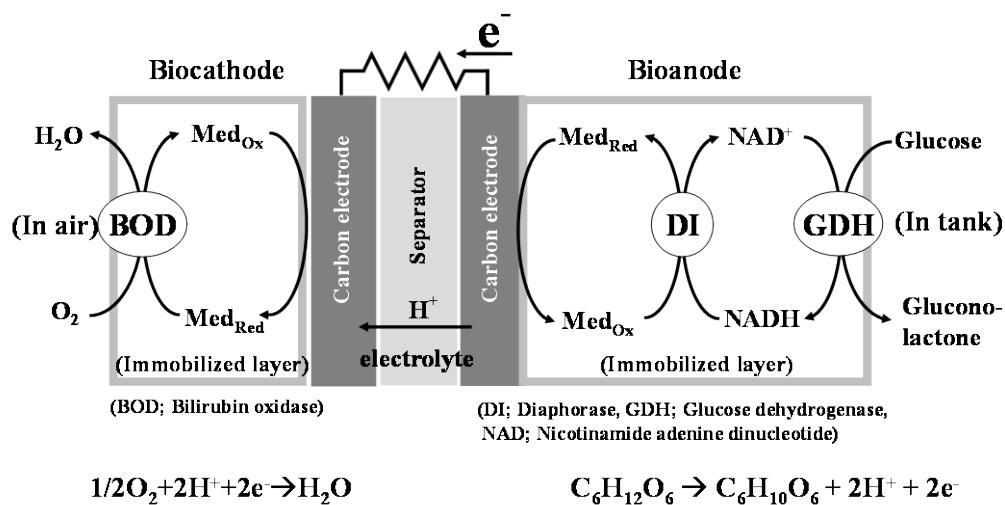


Figure 1 Structure of the mediated-electron-transfer type enzymatic biofuel cell

実験方法

試薬

Glucose dehydrogenase (GDH, EC 1.1.1.47) from *Bacillus sp.*、diaphorase (DI, EC.1.6.99.-) from *Bacillus stearothermophilus*、bilirubin oxidase (BOD, EC 1.3.3.5) from *Myrothecium verucaria*.は、天野エンザイム株式会社から購入し、精製なしに実験に用いた。 β -Nicotinamide adenine dinucleotide disodium salt (reduced form) (NADH)、poly-L-lysine (PLL, Mw = ca. 93,800)、polyacrylic acid sodium salt (PAA Na, Mw = ca. 30,000)は、シグマアルドリッチ株式会社から購入した。2-Methyl-1,4-naphthoquinone (vitamin K₃, VK₃)は、ナカライテスク株式会社から購入した。K₃[Fe(CN)₆]、glutaraldehyde (GA)は、和光純薬工業株式会社から購入した。Poly-L-lysine (PLL, Mw = ca 8,000 and 513,000)は、株式会社ペプチド研究所より購入した。ANQは、所定の方法⁷により合成した。3-mm ϕ のグラッシーカーボン (GC)平板は、ビー・エー・エス株式会社で購入した。カーボンファイバー (CF)シート(BO050, 厚さ750 μm)は東レ株式会社から購入し、10 mm角に切り抜いて、負極及び正極として用いた。セロハン膜はフタムラ化学株式会社から購入し、セパレーターとして用いた。Tiメッシュは株式会社サンクメタルから購入した。

電気化学測定

Cyclic voltammetry (CV)、及びlinear sweep voltammetry (LSV)は、1480 Multi-Stat (Solartron Analytical)を用いて、室温条件下3電極式で測定した。GC電極及び酵素修飾GC電極を作用電極、

Pt線を対極、Ag/AgCl (sat. KCl)を参照電極、とした。電解液は、sodium phosphate buffer (0.1M, pH 7.0)を用いた。

GCバイオ負極の作製

DI水溶液 (25 µg/ml in PBS(0.1 M, pH 8.0))を2 µl、PLL (Mw: 513,000)水溶液 (2 % (w/v))を3 µl、GA 水溶液 (0.125 %)を6 µl、ANQ又はVK₃溶液 (60 mM in acetone)を1 µl、GC電極上にこの順に滴下した。室温乾燥してできた修飾電極は、純水で洗浄後、電気化学測定に用いた。

CFバイオ負極の作製

CFシートは使用前に、UV. TC. 110 (BIOFORCE Nanosciences. Inc.)を用いて、オゾン処理をした。4枚重ねたCF電極上に、PLL (Mw: 93,800) 溶液 (2 % (w/v))を40 µl滴下した。40 °Cで15 min乾燥後、GDH水溶液 (1 U/µl in a 0.1 M PBS (pH 7.0))を32 µl、DI水溶液 (10 U/µl in the PBS)を32 µl、NADH水溶液 (0.9 µmol/µl in the PBS)を8 µl、をこの順で滴下した。室温で1時間乾燥後、VK₃又はANQ 溶液 (60 mM in acetone)を74.8 µl滴下した。40 °Cで15 min乾燥後、PBS (0.1 M, pH 7.0)を40 ml滴下して、40 °Cで30 min乾燥した。PBS滴下及び乾燥プロセスは3回繰り返した。

CFバイオ正極の作製

CFシートは、使用前にマイクロ波処理 (1800 W, 2 min) を行った。2枚に重ねたCF電極上に、potassium ferricyanate solution (100 mM in a 0.1 M PBS (pH 7.0))を160 µl滴下した。40 °Cで30 min乾燥後、PLL (Mw: 8,000)水溶液 (1 % (w/v))を160 µl滴下した。室温で2時間乾燥後、BOD水溶液 (50 mg/ml in a 0.1 M PBS (pH 7.0))を160 µl滴下した。室温で2時間乾燥したものを3つ重ねて、CFバイオ正極とした。

バイオ電池の評価

CFバイオ負極とCFバイオ正極の間にセロハンセパレータを挟んだ、パッシブ型バイオ電池を作製した (Figure 2)。0.4 M glucoseを含む1.0 M PBS (pH 7.0)を燃料溶液として用いた。

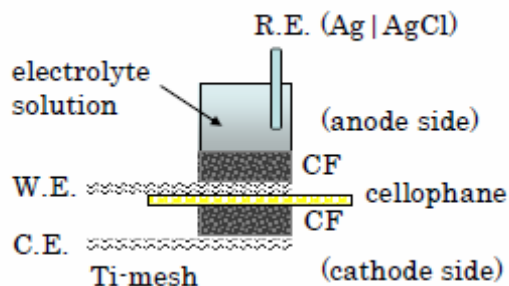


Figure 2 Schematic structure of the biofuel cell.

コンピュータシミュレーション

コンピュータシミュレーションにはアクセルリス社の Tsar プログラムを用いた。Figure 3 に示すナフトキノン骨格の 2 位と 3 位を 103 種類の置換基 (Tsar 内の構造データベース) で置換することで、5304 種類のナフトキノン類をコンピュータ上に発生させた。その後、Tsar に組み込まれている半経験的分子軌道プログラムである VAMP を用いて、発生させたすべてのナフトキノンの構造最適化を行い (PM3 法)、最低空軌道 (LUMO) のエネルギーを、式 1 に従って解析した。式 1 は酸化還元電位が分子の LUMO のエネルギーと比例関係にあることを表した経験式である。

$$E_{1/2} = a\varepsilon_{LUMO} + b \quad [1]$$

$E_{1/2}$ はナフトキノン類の酸化還元電位、 ε_{LUMO} は LUMO のエネルギー、 a と b は定数である⁸。またこれとは別に、全ナフトキノン類の LogP の値 (溶解度パラメータ) も Tsar を用いて計算した。酸化還元電位は既存のメディエータである 2-methyl-1,4-naphthoquinone (VK₃, -0.22 V vs. Ag|AgCl) や 2-Amino-3-carboxy-1,4-naphthoquinone (ACNQ, -0.26 V vs. Ag|AgCl) よりも 0.1 V ほど卑である -0.35 V を、LogP は酵素電極作成時に最適な -0.5 をターゲットとしてスクリーニングを行った。

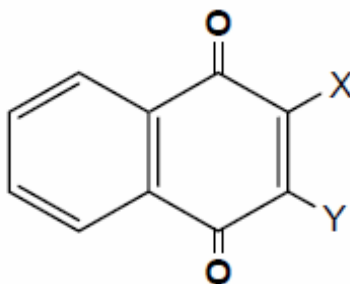


Figure 3 Base structure for the exploration of the electron mediator. X and Y parts are substituted to various substituents in silico.

結果及び考察

新規電子メディエータANQの評価

一般的に、負極触媒としてNAD依存型酵素を用いることで、glucoseなどの炭水化物を燃料として用いることができる。しかしながら、この反応は大きな過電圧を有している。数多くのNAD依存型脱水素酵素に関する研究がなされている中で、DIと電子メディエータを用いた系が過電圧を効果的に小さくできる⁹。このことから、このDIと電子メディエータを用いた系を負極に採用した。

第1章において、VK₃ (X = CH₃ and Y = H in Figure 3)を用いることで、1.5 mW cm⁻²の面積出力密度を達成した^{1,2}。しかしながら、VK₃を用いた場合においても、glucoseの理論酸化還元電位よりも0.5 V小さい顕著な電圧ロスがある。よって、出力を向上するためには、過電圧が小さい新しい電子メディエータを導入することが必要であった。

DIに対する電子メディエータに関して、VK₃やACNQ (X = NH₂ and Y = COOH in Figure 3)のようなnaphthoquinones (NQs)がバイオ負極として良い性能を示すことが報告されている¹⁰。従って、NQsを基本骨格とした新しい電子メディエータをコンピュータシミュレーションを使って設計した。その結果、ANQ (X = NH₂ and Y = H in Figure 3)が良い電子メディエータであることが分かった。

ANQは、VK₃ (-0.22 V)やACNQ (-0.26 V)と同様に可逆のCVを示し、その酸化還元電位は-0.36 Vとなった。これはシミュレーションからすると想定どおりである。一方、DIとの触媒電流値は、LFERの観点からすると、ANQの値はVK₃やACNQと比較して、かなり小さくなることが予想される¹⁰。しかしながら、Figure 4に示すようにDI-ANQの反応は予想に反してかなり大きく、触媒電流値の立ち上がり電位がACNQと比較して低くなっているにもかかわらず、同等の触媒電流値を示すことがわかった (Table 1)。

この要因はいまのところ明らかではないが、バイオ電池の電子メディエータとしては、理想的な性質を有することから、固定化系においても同様の性質を示すかどうかの検討を行った。PLL (Mw = 513,000)とGAを用いて、DIとVK₃もしくはANQをGC電極に固定化し、LSVの測定を行った。結果をFigure 5に示す。この図から明らかなように、固定化電極の系においても、ANQの系はVK₃の系と比較して、約0.2 V触媒電流の立ち上がり電位が卑側にシフトしており、尚且つ高い触媒電流値を維持していることがわかる。

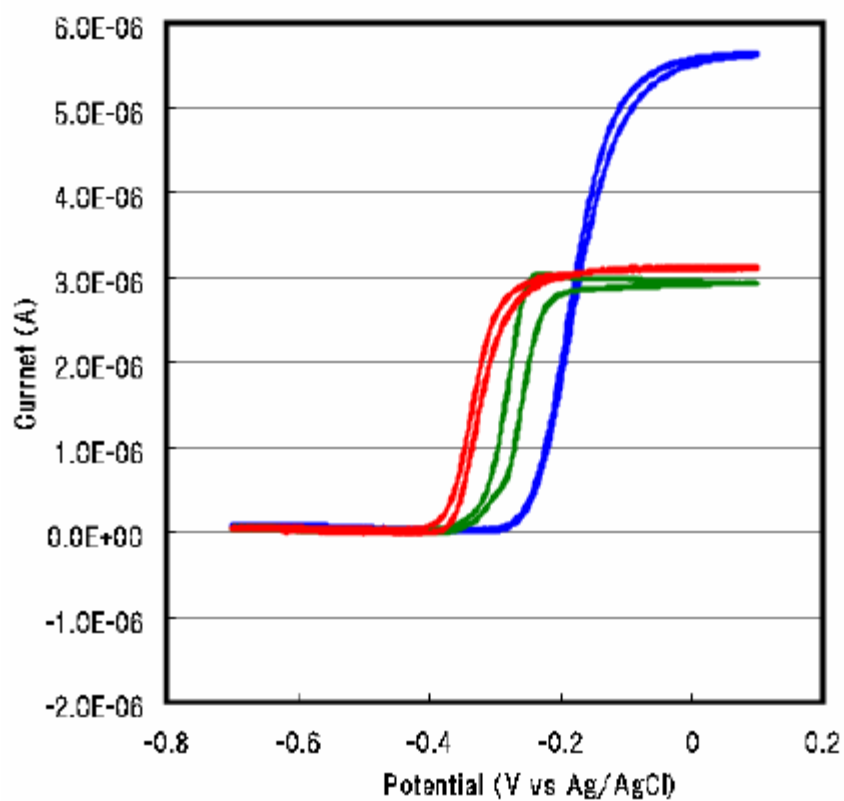


Figure 4 CV of VK₃ (blue), ACNQ(green), and ANQ (red) in the presence of 10 mM NADH and 0.16 μ M DI. Concentrations of mediators are 0.1 mM. Scan rate is 5 mV/sec.

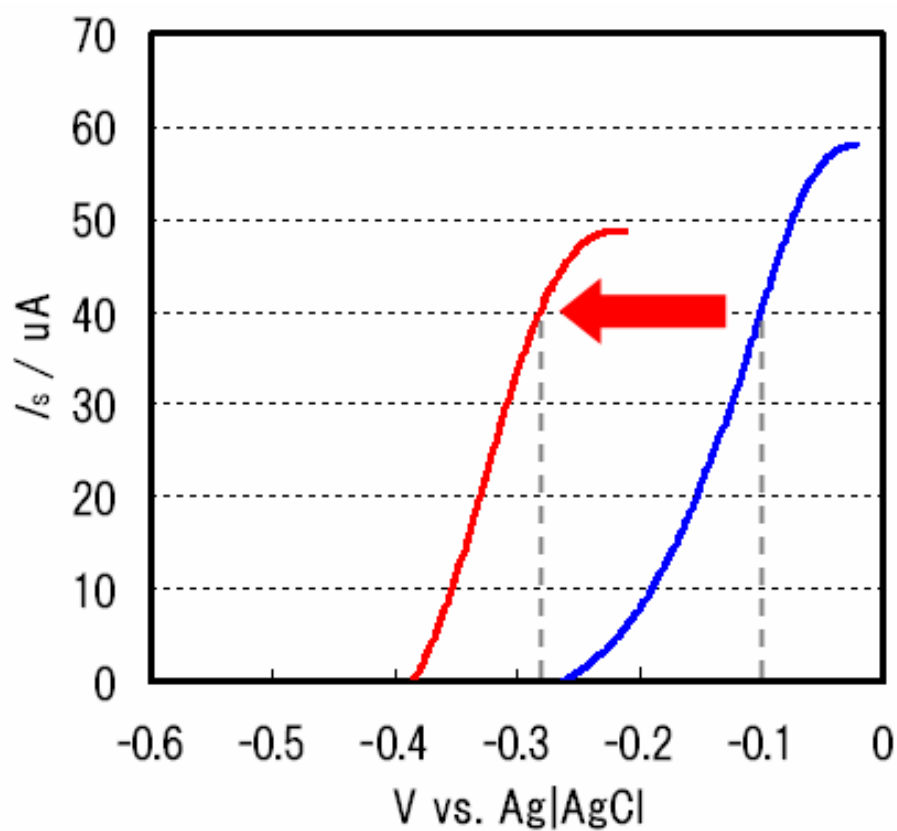


Figure 5 Linear sweep voltammetry for the immobilized electrodes using a VK₃ (blue) or a ANQ (red) as anode mediator. Scan rate: 5mV/sec, electrolyte solution: PBS (0.1 M, pH7.0).

Table 1. Kinetic parameters for DI-catalyzed electrochemical reaction of the mediators.

Mediators	Redox potential (V vs Ag/AgCl)	k_{cat} (sec ⁻¹)	K_M (μM)
VK ₃	-0.22	1300	0.4
ACNQ	-0.26	800	2.0
ANQ	-0.36	620	36

バイオ電池へのANQの導入

実セルでの測定結果をFigure 6, 7に示す。電子メディエータがVK₃の場合、開回路電圧が0.8 V、最高出力時の動作電圧が0.3 Vで1.5 mW cm⁻²を示した³。VK₃を電子メディエータに用いて、多層セルを作成し、電池体積当りの出力密度 (体積出力密度)が1.25 mW cm⁻³というパッシブ型バイオ電池としての世界最高出力を達成している。電子メディエータにANQを用いた場合、開回路電圧が0.9 V、最高出力時の動作電圧が0.5 Vで3.0 mW cm⁻²を達成した⁶。Figure 6に示すように、最大出力時の負極の動作電位が、VK₃の場合と比較して、0.2 V向上していることが分かる。

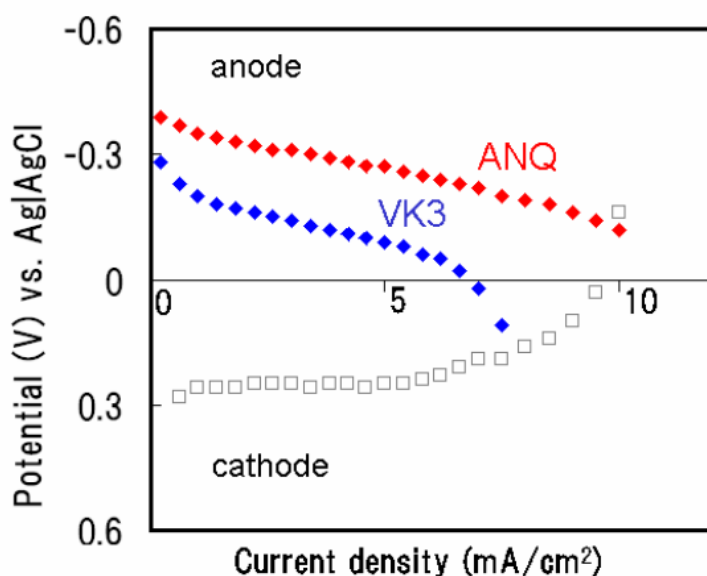


Figure 6 I-V curves of the biofuel cell. Red is ANQ and blue is VK₃.

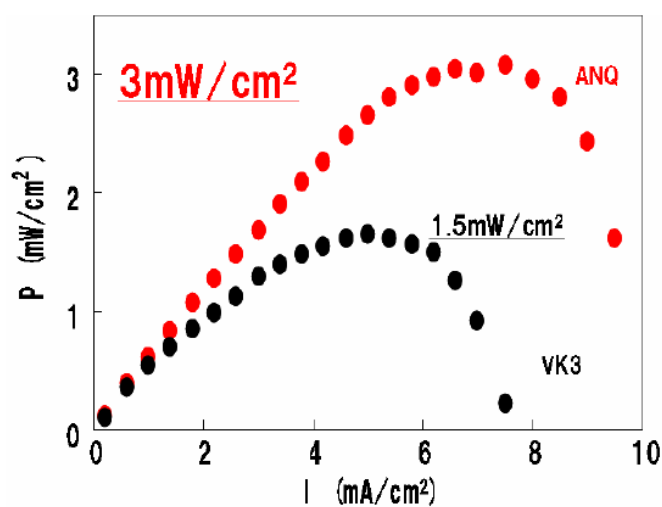


Figure 7 P-I curves of the biofuel cells. Red is ANQ and black is VK₃.

結論

コンピュータシミュレーションを用いることで、バイオ負極として新規な電子メディエータであるANQを見出した。ANQは酸化還元電位とDIに対する反応性の両面で優れた特性を有していることで、より低い電位での高い触媒電流値を達成した。ANQのDIに対する親和性は、VK₃やACNQと比較して小さいが、ANQを高密度に固定化した電極上ではその影響を小さくできた。最終的に、面積出力密度で、3.0 mW cm⁻²を達成した。

参考文献

1. H. Sakai, T. Nakagawa, Y. Tokita, and T. Hatazawa, *Prepr. Pap.-Am. Chem. Soc., Div. Fuel Chem.*, **52 (2)**, 632 (2007).
2. H. Sakai, T. Nakagawa, Y. Tokita, T. Hatazawa, T. Ikeda, S. Tsujimura, K. Kano, submitted.
3. S. Tsujimura, H. Tatsumi, J. Ogawa, S. Shimizu, K. Kano, and T. Ikeda, *J. Electroanal. Chem.*, **496**, 69 (2001).
4. E. Katz, I. Willner, and A. B. Kotlyar, *J. Electroanal. Chem.*, **479**, 64 (1999).
5. T. Chen, S. C. Barton, G. Binyamin, and Z. Gao, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 8630 (2001).
6. K. Kano and T. Ikeda, *Anal. Sci.*, **16**, 1013 (2000).
7. E. A. Couladouros, Z. F. Plyta, and S. A. Haroutounian, *J. Org. Chem.*, **62**, 6 (1997).
8. G. Hoijtink, *Rec. Trav. Chim.*, **74**, 1525 (1955).
9. H. Sakai, T. Nakagawa, Y. Tokita, and T. Hatazawa, *Prepr. Pap.-Am. Chem. Soc., Div. Fuel Chem.* **52 (2)**, 632 (2007).

第3章 電解液の再設計

要旨

第2章でセルでの面積出力密度 3 mW cm^{-2} を達成した正極 (大気暴露型, OA-cell)において、定電圧測定1時間後の電極表面の局所 pH を測定した結果、バルク電解液の pH 7.0 に対して、pH 8.5 以上まで大きく増加していることがわかった。これは、高い還元触媒電流のために正極内でのプロトン消費速度が大きく、高濃度のリン酸緩衝物質でもその変化を抑制することができず、正極酵素ビリルビンオキシダーゼ (BOD)の活性が低下したためと考えた。そこで、各種緩衝物質及び濃度のスクリーニングを行った。その結果、イミダゾールを用いた場合、局所 pH が8以下にまで抑制され、触媒電流値は、リン酸と比較して2 M の濃度で5倍に大きく向上した。このイミダゾールが優れる要因の1つには、高濃度化に伴う粘度の増加がリン酸よりも小さいことが挙げられる。2 M イミダゾールを含む電解液を導入することで、面積出力密度は 5.0 mW cm^{-2} at 0.5 V と1.7倍に増大した。

以上の高出力化の要素技術に加え、正極において、親疎水性を制御し、プロトン及び酸素供給能が優れた半浸水型正極を開発した。その結果、面積出力密度として 10 mW cm^{-2} at 0.5 V を達成した。さらにこれらの要素技術を導入し、厚膜状電極の積層型酵素 BFC を試作することで、小型電子機器の動作を成功し、電池の体積出力密度として最大で 5 mW cm^{-3} を達成した。

緒言

ここまで、バイオ電池を搭載した実用的なアプリを実現するために、高出力を実現する技術を開発してきた。 1.5 mW cm^{-2} の面積出力密度の技術を導入した、 50 mW (40 cc)の出力を有するパッシブ型積層型バイオ電池ユニットで、メモリー型ウォークマンとRCカーの動作を実現できたことを報告した^{6,7}。この性能は、以下の3つの技術で実現できた。1) 酵素活性を失わせずに酵素と電子メディエータをカーボンファイバー電極上に高密度に保持する技術、2) 固定化された酵素に対して、電解液 (sodium phosphate buffer)の濃度を最適化する技術、3) 正極構造を酸素を効率的に供給するように設計する技術^{6,7}、さらに負極用新規電子メディエータ、2-amino-1,4-naphthoquinone (ANQ)を導入することで、 3.0 mW cm^{-2} を達成した。このANQは、従来用いられてきた、2-methyl-1,4-naphthoquinone (vitamin K₃, VK₃)^{7,9}の酸化還元電位 -0.22 V (vs. Ag|AgCl)よりもネガティブな酸化還元電位 -0.36 V (vs. Ag|AgCl) (8)を有している。

本章では、イオン液体であるイミダゾール imidazole を含む新規電解液 (imidazole/HCl buffer, 2 M, pH 7)について議論する¹⁰。

メディエータ型バイオ電池の構成を Figure 1 に示す。特に、バイオ負極とバイオ正極の酵素が効率的に働くためには、両極中で十分なプロトン移動することが重要である。これまでのバイオ電池の系においては、プロトン移動が律速段階の一つと推測した。それは、通常の動作条件においては、バイオ負極とバイオ正極中で pH 変化が起こっていたからである⁷。この問題を解決するために、多種の緩衝液の条件を検討し、新しい電解液 (imidazole/HCl buffer, 2 M, pH 7) を見出した。

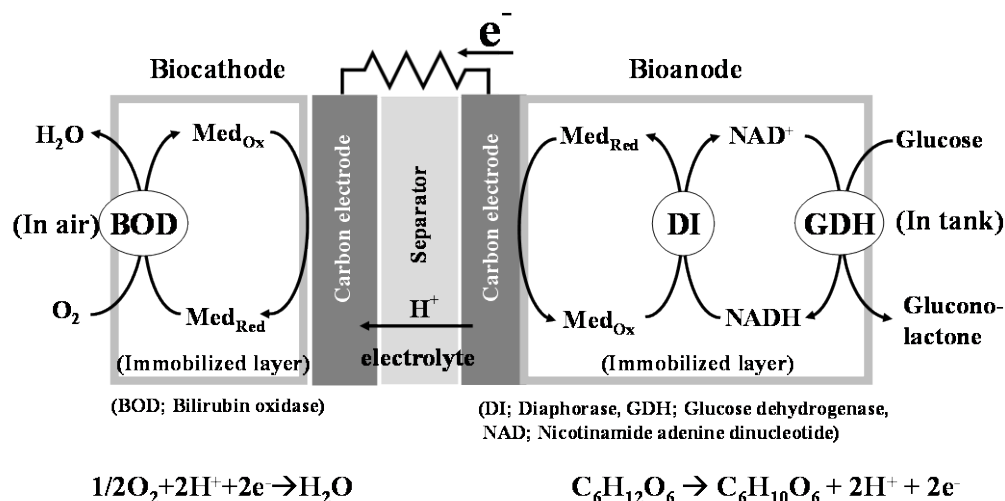


Figure 1 Structure of the mediated-electron-transfer type enzymatic biofuel cell

実験方法

試薬

Glucose dehydrogenase (GDH, EC 1.1.1.47) from *Bacillus sp.*、diaphorase (DI, EC.1.6.99.-) from *Bacillus stearothermophilus*、bilirubin oxidase (BOD, EC 1.3.3.5) from *Myrothecium verucaria*.は、天野エンザイム株式会社から購入し、精製なしに実験に用いた。 β -Nicotinamide adenine dinucleotide disodium salt (reduced form) (NADH)、poly-L-lysine (PLL, Mw = ca. 93,800)、polyacrylic acid sodium salt (PAANa, Mw = ca. 30,000)は、シグマアルドリッチ株式会社から購入した。2-Methyl-1,4-naphthoquinone (vitamin K₃, VK₃)は、ナカライテスク株式会社から購入した。K₃[Fe(CN)₆]、glutaraldehyde (GA)は、和光純薬工業株式会社から購入した。Poly-L-lysine (PLL, Mw = ca 8,000 and 513,000)は、株式会社ペプチド研究所より購入した。ANQ は、所定の方法¹¹により合成した。3-mm ϕ のグラッシーカーボン(GC)平板は、ビー・エー・エス株式会社で購入した。カーボンファイバー (CF)シート(BO050, 厚さ 750 μ m)は東レ株式会社から購入し、10 mm 角に切り抜いて、負極及び正極として用いた。セロハン膜はフタムラ化学株式会社から購入し、セパレータとして用いた。Ti メッシュは株式会社サンクメタルから購入した。

電気化学測定

Cyclic voltammetry (CV) 及びlinear sweep voltammetry (LSV)は、1480 Multi-Stat (Solartron Analytical)を用いて、室温条件下3電極式で測定した。GC電極及び酵素修飾GC電極を作用電極、Pt線を対極、Ag/AgCl (sat. KCl)を参照電極、とした。電解液は、sodium phosphate buffer (PBS, pH 7.0)、及びimidazole/HCl buffer solution (IBS, pH 7.0)を用いた。

CFバイオ負極の作製

CF シートは使用前に、UV. TC. 110 (BIOFORCE Nanosciences. Inc.)を用いて、オゾン処理をした。4枚重ねたCF電極上に、PLL (Mw: 93,800)水溶液 (2 % (w/v))を40 μ l滴下した。40 °Cで15 min 乾燥後、GDH 水溶液 (1 U/ μ l in a 0.1 M PBS (pH 7.0))を32 μ l、DI 水溶液 (10 U/ μ l in the PBS)を32 μ l、NADH 水溶液 (0.9 μ mol/ μ l in the PBS)を8 μ l、をこの順で滴下した。室温で1時間乾燥後、VK₃又はANQ溶液 (60 mM in acetone)を74.8 μ l滴下した。40 °Cで15 min 乾燥後、PBS solution (0.1 M, pH 7.0)を40 ml滴下して、40 °Cで30 min 乾燥した。PBS滴下及び乾燥プロセスは3回繰り返した。

CF バイオ正極の作製

CF シートは、使用前にマイクロ波処理 (1800 W, 2 min)を行った。2 枚に重ねた CF 電極上に、potassium ferricyanate 水溶液 (100 mM in a 0.1 M PBS (pH 7.0))を 160 μ l 滴下した。40 $^{\circ}$ C で 30 min 乾燥後、PLL (Mw: 8,000)水溶液 (1 % (w/v))を 160 μ l 滴下した。室温で 2 時間乾燥後、BOD 水溶液 (50 mg/ml in a 0.1 M PBS (pH 7.0))を 160 μ l 滴下した。室温で 2 時間乾燥したものを 3 つ重ねて、CF バイオ正極とした。

CF バイオ正極の評価

大気暴露型 (open-air type)の評価セル (Figure 2)を用いて、CF バイオ正極の触媒電流を測定した。このセル中では、酸素が空気から CF バイオ正極へ効率的に拡散することができる。電気化学測定と同時に、CF バイオ正極上の局所 pH の値を、平面構造を持つ pH メータ (TYPE PCE308S-SR, Toko Chemical Laboratory Ltd., Japan)を正極に接触させることで、測定した。

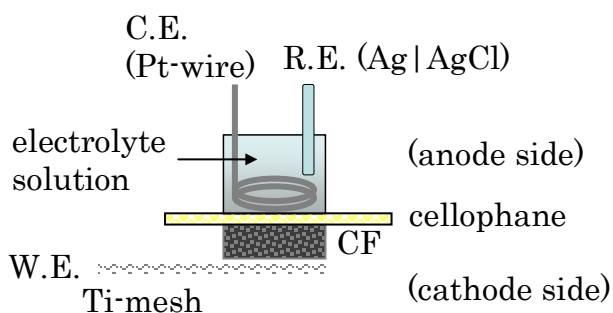


Figure 2 Electrochemical measurement cell for the CF-biocathode (open-air type cell).

バイオ電池の評価

CFバイオ負極とCFバイオ正極の間にセロハンセパレータを挟んだパッシブ型バイオ電池を作製した(Figure 3)。0.4 M glucoseを含む1.0 M PBS (pH 7.0)、2 M IBS (pH 7.0)を燃料溶液として用いた。

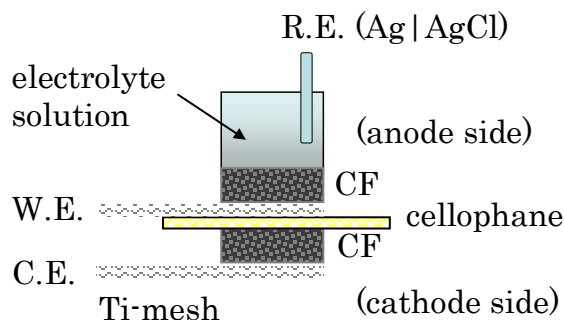


Figure 3 Electrochemical measurement cell for the biofuel cell (open-air type cell).

結果及び考察

バイオ正極の電気化学測定と局所 pH 測定

報告されているバイオ電池の面積出力密度は、機械的攪拌やポンプのような燃料と酸素の対流システムを用いたとしても、数 mW cm^{-2} のオーダー内であった¹⁻⁵。酸素、燃料、電解液の物質輸送はバイオ電池の反応速度を増大させるために重要なステップである。従って、高い空隙率と高い比表面積を有する炭素電極、大気暴露型正極、電解液としての高濃度リン酸緩衝液 (PBS, 1 M, pH 7.0)、を導入することで、反応速度を改善してきた⁷。しかしながら、両極においてプロトン輸送の向上は充分ではなかったため、多種の緩衝溶液を検討し、濃度の最適化を行った。その結果、現在の系のプロトン輸送に対して、imidazole/HCl buffer (IBS, 2 M, pH 7.0)が最適であることが分かった。Figure 4 にバイオ正極の局所 pH 測定と電気化学測定の結果を示す。

溶液中の BOD は pH 7 付近で活性があるので¹²、局所 pH は 7 付近になるべきである。しかしながら、2 M PBS (pH 7.0)を用いた場合であっても、局所 pH (opened square, red)は pH8.5 付近まで増大した。この pH の変化によって、固定化膜中の BOD 活性は低下する。なぜなら、正極反応は、 $\text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^- \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$ 、と進行するので、溶液中の BOD 活性は pH 7 を超えると急激に低下することが分かっているからである¹²。従って、PBS を用いた場合の電流密度 (closed square, red)は、低い値 (about 20 % relative current even at 2.0 M)であった。このことから、バイオ正極中のプロトン移動が律速段階であることが示唆された。

一方、IBS の濃度を増大させることで、局所 pH (opened square, blue)は、pH 8 以下に抑制され、電流密度 (closed square, blue)が濃度の増大に伴い、著しく増大した。2 M の時に最大の電流を示し、PBS の場合と比較して、5 倍高くなった。従って、電流密度の低下は電極中の不十分なプロトン移動と良く対応すると推定される。Figure 4 に示すように、実際、高濃度の IBS システムは、局所 pH 変化を抑制することと電流密度を向上させることに特に効果的である。

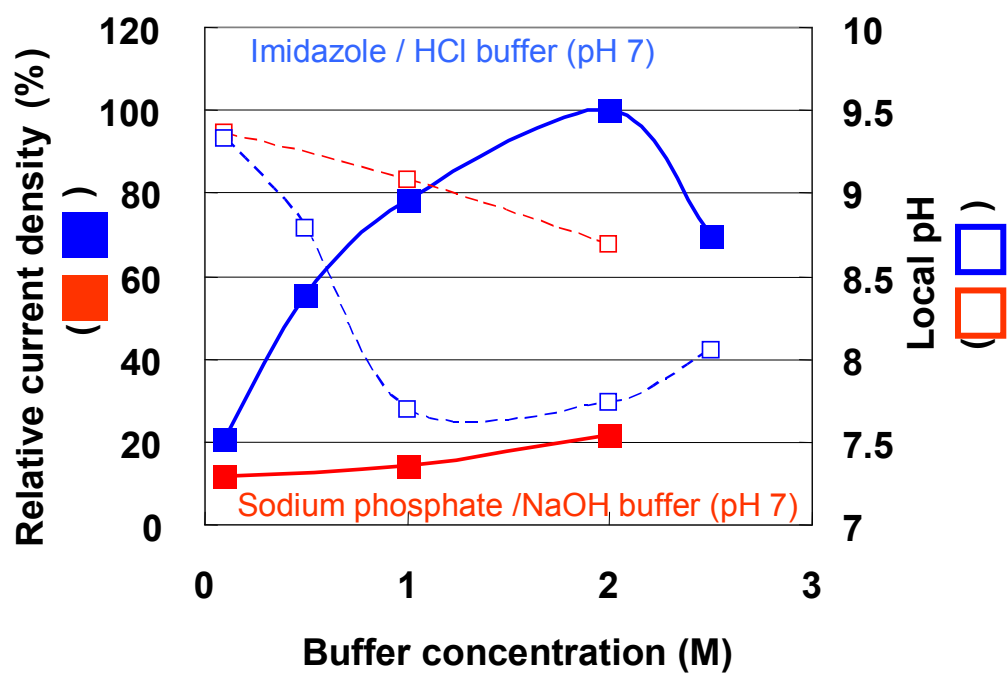


Figure 4 Relative current densities and local pH values depending on buffer concentrations about the biocathode using the measurement cell (Figure 2). Closed squares are relative current densities in steady state after 1 hour-CA. Opened squares are local pH values on the biocathode. Red and blue are sodium phosphate buffer (PBS) and imidazole/HCl buffer (IBS), respectively.

バイオ電池への IBS システムの導入

Figures 5, 6 に、I-V 曲線と I-P 曲線をそれぞれ示す。これまでに、 1.5 mW cm^{-2} at 300 mV (black) の面積出力密度を用いて、Walkman 及び RC カーのデモンストレーションを行った^{6,7}。さらに、負極電子メディエータとして、従来の VK_3 よりも低い酸化還元電位を有する、2-amino-1,4-naphthoquinone (ANQ)を導入することで、500 mV で 3.0 mW cm^{-2} (red)を達成した(8) (Figure 5)。これらの結果は、PBS (1 M, pH 7.0)を用いて得られた。

新規電解液として IBS (2 M, pH 7.0)を用いた場合、最大の面積出力密度は、 5.0 mW cm^{-2} at 500 mV (blue)に達した。評価セル (Figure 3)でそれぞれの電位で見積られた還元電流密度は、バイオ正極単極評価セル (Figure 2)で得られた値とほぼ一致した。バイオ負極の電流密度も、バイオ正極と同様に増大した (Figure 5)。これは、IBS を用いた場合は、PBS と同様に mA cm^{-2} の電流密度下においても、セル電位を効果的に維持することもできることを示唆している。

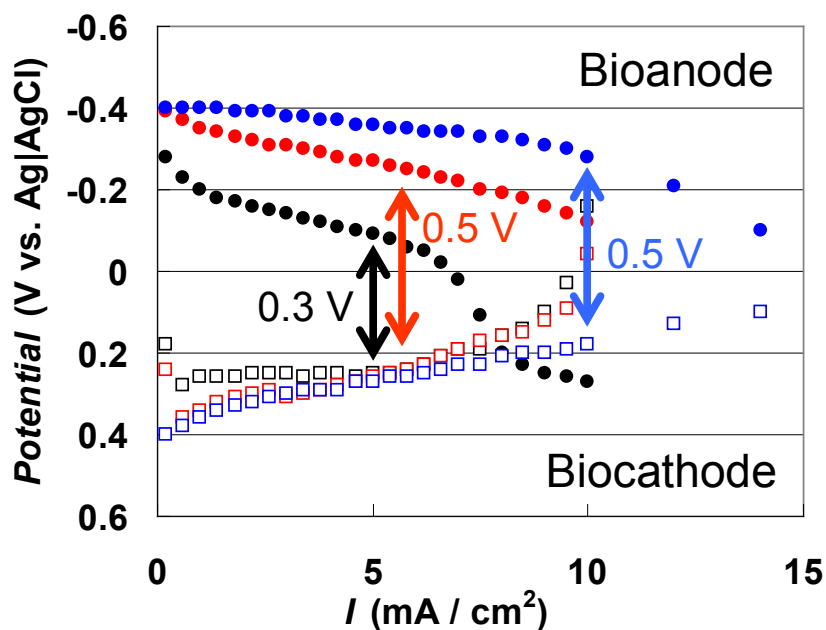


Figure 5 I-V curves of the biofuel cell using the measurement cell (Figure 3). Black is VK_3 with PBS (1 M, pH 7.0), red is ANQ with PBS (1 M, pH 7.0) and blue is ANQ with IBS (2 M, pH 7.0). Closed circle is bioanode and opened square is biocathode.

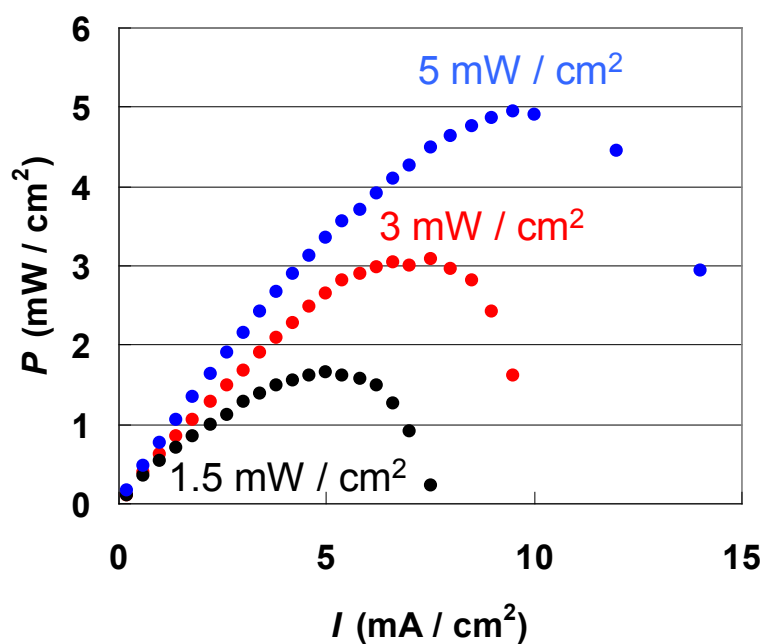


Figure 6 I-P curves of the biofuel cells. Black is VK_3 with PBS (1 M, pH 7.0), red is ANQ with PBS (1 M, pH 7.0) and blue is ANQ with IBS (2 M, pH 7.0).

結論

静止系での glucose/oxygen バイオ電池の出力密度を向上させるために、電極中のプロトン移動が、PBS を用いた従来のバイオ電池系において、律速段階であることを明らかにし、imidazole/HCl buffer (IBS, 2 M, pH 7)がプロトン移動に対して、圧倒的に効果があることを見出した。この imidazole/HCl buffer (IBS, 2 M, pH 7)を導入することで、最大の面積出力密度は、 5.0 mW cm^{-2} at 500 mV を示した。

参考文献

1. K. Kano (supervising editor), *Recent Progress in Biofuel Cells*, CMC Publishing (2011). [in Japanese]
2. A. Heller, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **6**, 209 (2004).
3. S. C. Barton, J. Gallaway, and P. Atanassov, *Chem. Rev.*, **104**, 4867 (2004).
4. G. T. R. Palmore, and G. M. Whitesides, *ACS Symp. Ser.*, **556**, 271 (1994).
5. K. Kano, T. Ikeda, *Electrochemistry*, **71** (2), 86 (2003).
6. E. Katz, and I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 6803 (2003).
7. <http://www.sony.net/SonyInfo/News/Press/200708/07-074E/index.html>
8. H. Sakai, T. Nakagawa, Y. Tokita, T. Hatazawa, T. Ikeda, S. Tsujimura, and K. Kano, *Energy Environ. Sci.*, **2** 133 (2009).
9. Y. Tokita, T. Nakagawa, H. Sakai, T. Sugiyama, R. Matsumoto, and T. Hatazawa, *ECS Trans.*, **13** (21), 89 (2008).
10. K. Takagi, K. Kano, and T. Ikeda, *J. Electroanal. Chem.*, **445**, 209 (1998).
11. A. Noda, M. A. B. H. Susan, K. Kudo, S. Mitsushima, K. Hayamizu, and M. Watanabe, *J. Phys. Chem.*, **B 107**, 4024 (2003).
12. E. A. Couladouros, Z. F. Plyta, and S. A. Haroutounian, *J. Org. Chem.*, **62**, 6 (1997).
13. Amano enzyme Inc., *AMANO ENZYMES for Diagnostics*, (2001/2002).

第 4 章 容量向上を目指した glucose 代謝系の検討

要旨

ここまで第 1 章から第 3 章までで述べてきた電池系の負極に関わる glucose の酸化反応は、完全酸化 24 電子に対して 2 電子のみである (Figure 1)。glucose からの 4 電子以降の酸化反応については検討した結果、現時点で分解速度が非常に遅く実用的ではないことがわかった。そこで、生体内に存在する pentose phosphate (PP) 回路を *in vitro* で再構成し、glucose-6-phosphate (G6P) を燃料とし CO₂ までの完全酸化を目指した電解反応系を検討した。その結果、PP 回路が機能することを確認し、さらに PP 回路の酵素群中の律速段階にある酵素活性を増強することで、G6P を燃料とした 24 電子反応に対する電子回収率 40% (9.6 電子に相当) を達成した (Figure 3 の inset (b))。これは、glucose 燃料の完全酸化による高容量酵素 BFC の実現の可能性を示す成果である。

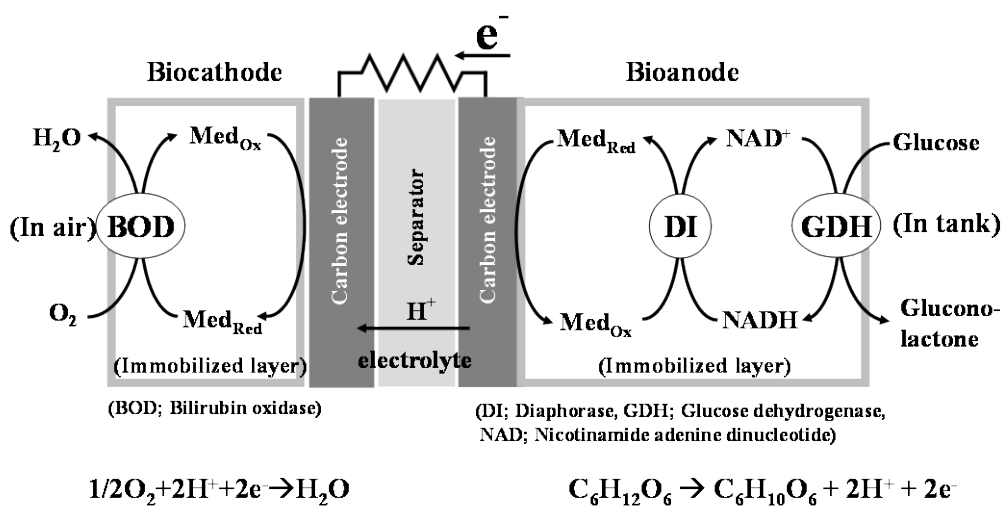


Figure 1 Structure of the mediated-electron-transfer type enzymatic biofuel cell

緒言

バイオ電池の実用化に向けては、出力、容量、耐久性といった面でいくつかの課題がある。ここまで、glucose を燃料とした酵素バイオ電池に関して、特に出力の向上に注力し、電極及び電解溶液についての技術開発を進め⁴、世界に先駆けて 10 mW cm⁻²の面積出力密度を達成した^{5,6}また容量及び耐久性に関しても、酵素及び電極材料について開発を行った^{5,7,8}。

本章では、容量に焦点を当てる。Glucose 1 分子の完全酸化により、理論的には 24 電子を取り出せる。しかし現状の glucose/O₂-酵素バイオ電池では、1 つの酵素 (glucose dehydrogenase, GDH 等)を用いて 2 電子分だけの電気量を取り出すのが一般的である (Figure 1)。この系に gluconate-5-dehydrogenase (Gn5DH)を連結させることで、4 電子の取り出しが報告されているが⁵、さらに実効的な電解電子数を増加することは困難である。

これに対して、生体内に存在する代謝系を人工的に構築する試みがある。例えば、tricarboxylic acid cycle (TCA 回路)を再構成し、酵素触媒型 NADH 電解酸化系と共役することによって、乳酸の 12 電子反応系で電子回収率 70%を実現されている⁹。ただし、glucose を燃料とする場合には、この TCA 回路の上流に解糖系を連結する必要がある。他に利用できる代謝系として、pentose phosphate pathway (PP 経路) (Figure 2)が挙げられる。本経路では、glucose-6-phosphate (G6P) 1 分子が、2 つの不可逆な酸化段階と多数の可逆な非酸化過程により 24 電子酸化され、式 (1)のように還元型 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) 12 分子が生成される。



これまで、PP 経路構成酵素と hydrogenase を用いた glucose 等の H₂ へ変換系に関する報告¹⁰⁻¹³はあるが、電極反応系で定量的に電子回収率を議論した例はない。そこで本章では、G6P を燃料とした 24 電子酸化反応系の構築を目的として、PP 経路を用いた電解反応を行った結果について報告する。

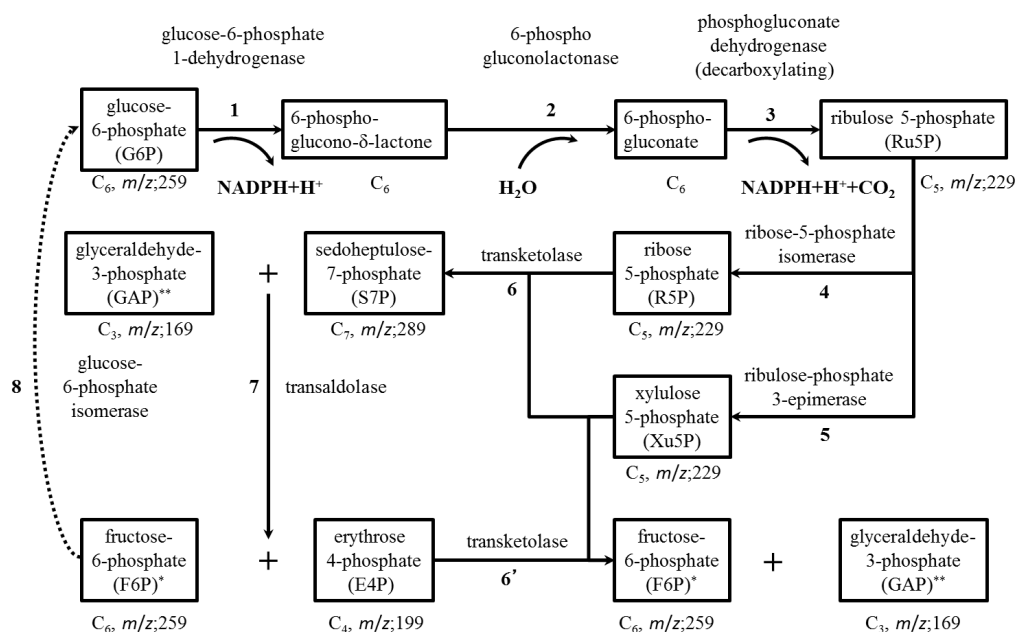


Figure 2 The pentose phosphate pathway for glucose-6-phosphate (G6P) oxidation.

Enzyme 1; G6P dehydrogenase (EC 1.1.1.49), 2; 6-phospho gluconolactonase (EC 3.1.1.31), 3; phosphogluconate dehydrogenase (EC 1.1.1.44), 4; ribose-5-phosphate isomerase (EC 5.3.1.6), 5; ribulose-phosphate 3-epimerase (EC 5.1.3.1), 6 and 6'; transketolase (EC 2.2.1.1), 7; transaldolase (EC 2.2.1.2), 8; G6P isomerase (EC 5.3.1.9).

実験方法

試薬

PP経路に関わる酵素はFigure 2に示すとおりであり、以下、図中の酵素番号を用いて示す。これら酵素群は(株)耐熱性酵素研究所より購入した。Diaphorase (DI)は天野エンザイム(株)； NADP^+ 、G6P、及びPP経路反応中間体はシグマアルドリッチジャパン(株)から購入した。電子メディエータとして用いた2-carboxy 3-amino-1,4-naphthoquinone (ACNQ, $E^\circ = -0.26 \text{ V vs. Ag|AgCl|KCl (sat.)}$, pH 7)は文献¹⁴に従って合成した。

電解実験

バルク電解は、電気化学測定装置 (ALS630A)を用い3電極式で行った。カーボンフェルト(東レ製 BO050、厚さ 750 μm 、直径 6 mm)を3枚重ねて作用極とし、直径 0.5 mm の Pt ワイヤをリード線とした。直径 0.8 mm の Pt ワイヤを対極、 $\text{Ag|AgCl (sat. KCl)}$ を参照電極とした。対極及び参照電極は KCl 塩橋で作用極から隔離した。0.1 M リン酸緩衝液(pH 7、総量 150 μL)を電解液とし、所定の酵素、補酵素、電子メディエータを加えて、Ar 置換後、スターラーで攪拌下 0.2 V、25 $^\circ\text{C}$ にて電解した。理論クーロン数を $Q_t = nFN$ (n : 酸化反応過程の電子数、 F : ファラデー定数、 N : 物質質量)、実験的に得られるクーロン数を Q とするとき、電子回収率は Q/Q_t 、見かけの電子数は Q/FN として表す。

キャピラリー電気泳動/質量分析 (CE/MS)

PP 経路反応中間体の CE/MS 測定は(株)住化分析センターに依頼した。Agilent Technologies CE/MS システムにて、コーティングキャピラリー(ナカライテスク SMILE (+)、内径 50 μm 、長さ 100 cm)を用い、泳動液 50 mM ammonium formate (pH 8.5)、温度 20 $^\circ\text{C}$ 、印加電圧 30 kV (negative mode)にて分離し、イオン化電圧 100 V で Figure 2 に示す $m/z = 169, 199, 229, 259, 289$ のイオンを選択的に検出した。

結果及び考察

G6P を燃料とした電解実験①

PP 経路では、脱水素酵素 **1** と **3** の反応により NADPH が生ずる。NADPH の電極酸化反応の過電圧は非常に大きいので、本実験では DI を触媒とするメディエータ型酵素電極触媒反応を利用した。つまり DI により ACNQ を還元し (式 2)、還元型 ACNQ を電極で再酸化する (式 3)。

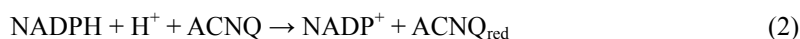


Figure 2 に示す酵素 **1**～**8** 及び DI と、 NADP^+ 4.7 mM、ACNQ 30 μM を添加し、燃料としての G6P を $N_{\text{G6P}} = 4 \mu\text{mol}$ 加えバルク電解した時の結果を Figure 3 に示す。測定溶液に G6P を注入直後、酸化電流の鋭い立ち上がりが観測された。この電流は PP 経路で生成された NADPH の酸化反応(式(2), (3))に由来する。バルク電解の電流 - 時間曲線は、15 min ほどまでの急速な減少と、それに続く非常に穏やかな減少からなる 2 相系を示した。本条件では、PP 経路の反応速度に比べて、式(2), (3)の反応速度が極めて大きくなるよう設定したので、観測される酸化電流は PP 経路の脱水素酵素(**1**, **3**)による NADPH 生成速度の和を反映する。従って、15 min ほどまでの急速な電流減少は、G6P の枯渇によるものと考えられる。0～15 min の電解では見かけの電子数 $Q/FN_{\text{G6P}} = 1.9$ となったことから、この電流は主に脱水素酵素 **1** の反応で生じた NADPH の電解酸化に起因する。また、0～2 h で $Q/FN_{\text{G6P}} = 3.8$ となることから、15 min 以降の酸化電流は、主に脱水素酵素 **3** の反応で生じた NADPH の電解酸化に起因すると推察した。

一方、2～6 h の電流は極めて小さくその間では $Q/FN_{\text{G6P}} = 0.3$ にしか至らなかった。これらの結果から、本条件では酵素 **3** までの反応は比較的速いがそれ以降は非常に遅く、酵素 **8** の反応で生成される G6P 量は極めて少ないことが示唆された。

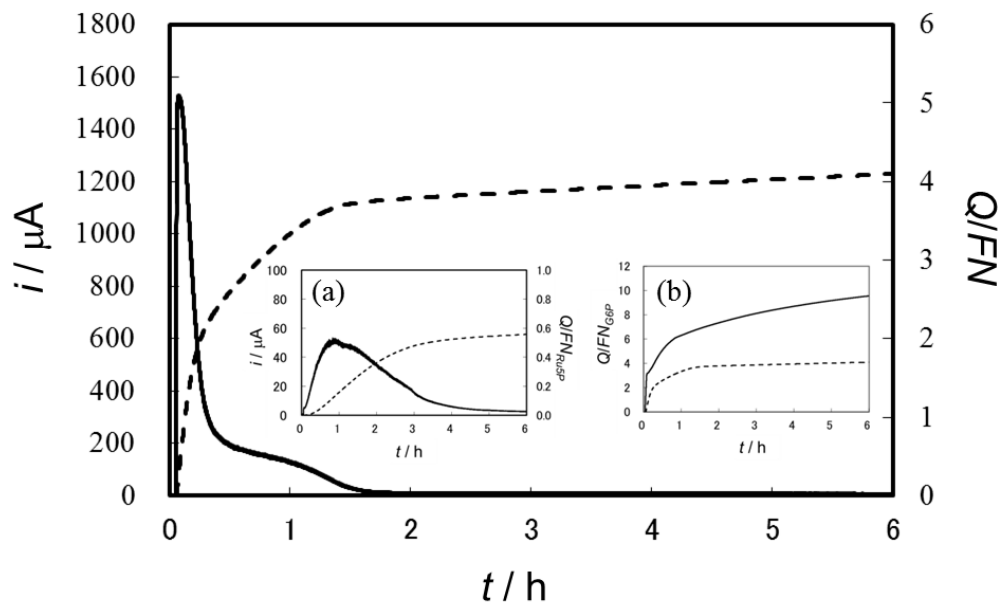


Figure 3 Current (i , solid curve) and apparent number of electron (Q/FN , broken curve) as a function of the electrolysis time (t) for electrolysis of 4 μmol G6P ($\text{NG6P} = 4 \mu\text{mol}$).

The total activities of the enzymes (1 to 8 and DI) were 1: 6.4 U, 3: 7 U, 4: 0.3 U, 5: 11.2 U, 6: 0.2 U, 7: 0.1 U, 8: 26.5 U, and DI: 40 U. The electrolysis was done at 0.2 V and at 25 °C in phosphate buffer (pH 7.0) containing NADP^+ (4.7 mM) and ACNQ (30 μM). Inset (a) shows i and Q/FN vs. t for electrolysis of 4 μmol Ru5P ($\text{NRu5P} = 4 \mu\text{mol}$). The other conditions are identical with those in Figure 2. Inset (b) shows the time course of Q/FN in mediated bioelectrocatalysis of G6P ($\text{NG6P} = 4 \mu\text{mol}$). The broken curve shows that in Fig. 2. The electrolysis conditions of the solid curve were identical with those in Figure 3 except enzyme 7, of which the total unit is 10 times larger than that in Figure 3.

Ribulose-5-phosphate (Ru5P)を燃料とした電解実験②

上記の考察を実証するために、初発酸化物として G6P の代わりに Ru5P を用い、その他の条件は電解実験①と同一にして電解実験を行った ($N_{\text{Ru5P}} = 4 \mu\text{mol}$)。Figure 3 の inset (a)に示すように、Ru5P 添加後、G6P を燃料とした場合のような鋭い電流増加は見られず、時間と共に徐々に増大し、1 h ほどでピークとなり、その後緩やかに減少した。この緩やかな電流増加は、PP 経路による G6P の生成を反映していると推察した。しかし、0~6 h の電解でも $Q/FN_{\text{Ru5P}} = 0.6$ であり、緩やかな電流現象がみられることも含めて、時間とともに酵素活性が低下していると思われる。

続いて反応中間体の解析を行うために、電解 6 h 後の溶液を回収し、除タンパク後 CE/MS 測定を行った。Figure 2 に示すそれぞれの反応中間体の m/z に対応するエレクトロフェログラムを Figure 4 に示す。Ru5P からの反応中間体としては特に、sedoheptulose-7-phosphate (S7P)のピーク面積が他と比較して大きいことがわかる。このことは、本条件では、酵素 7 の活性量が他の酵素と比較して小さいために、中間体としての S7P が蓄積し、それ以降の反応が遅いことを示唆している。ただし反応中間体として、fructose-6-phosphate (F6P)、glyceraldehyde-3-phosphate (GAP) が観測されていることから、一連の G6P 再生反応は非常に遅いながらも進行していることが支持された。

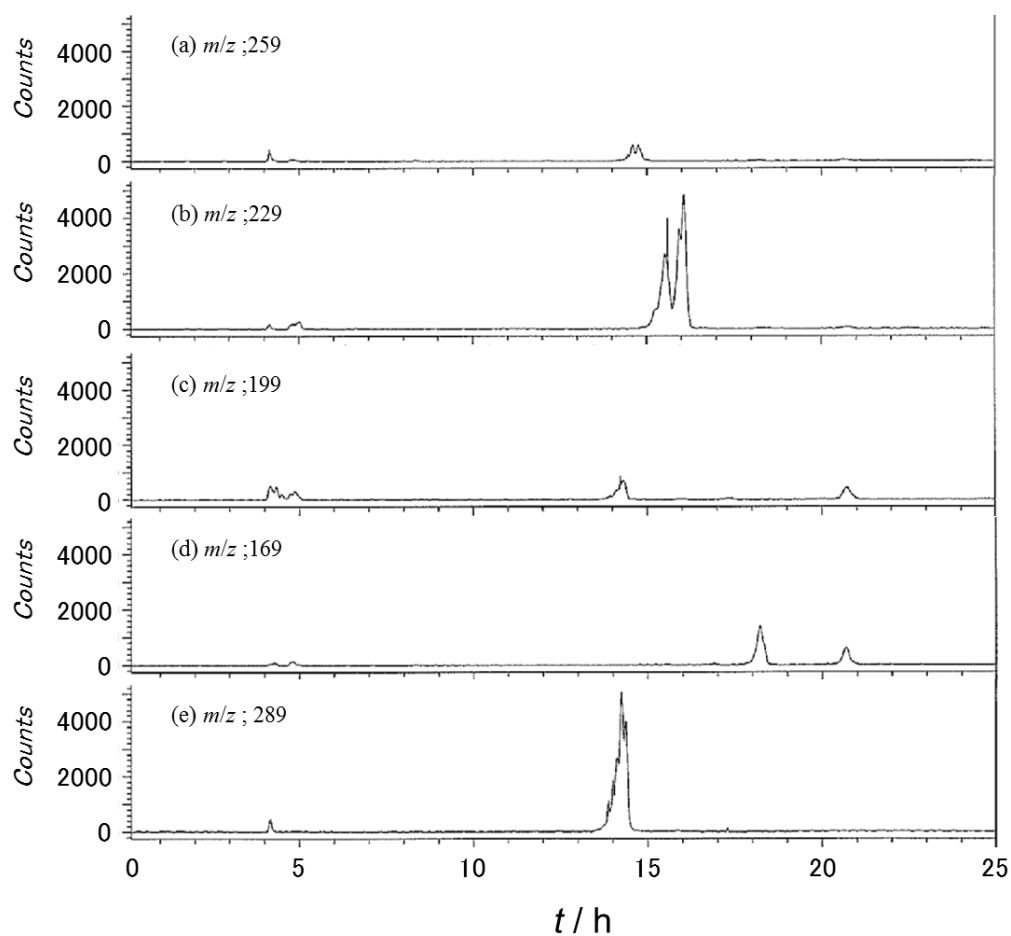


Figure 4 The electropherograms using selected ion-monitoring technique in CE/MS. The sample was taken from the 6 h-electrolysis solution shown in inset (a) of Figure 3. The target analyte of each electropherogram is (a) m/z ; 259 (glucose-6-phosphate and fructose 6-phosphate), (b) m/z ; 229 (ribulose 5-phosphate, ribose 5-phosphate and xylulose 5-phosphate), (c) m/z ; 199 (erythrose 4-phosphate), (d) m/z ; 169 (glyceraldehyde-3-phosphate), and (e) m/z ; 199 (sedoheptulose-7-phosphate).

G6P を燃料とした電解条件の検討 (電解実験③)

上記の考察より、PP 経路で迅速に G6P を生成させるために、酵素 7 の活性量を 10 倍に増加して再検討した。他の条件は電解実験①のそれと同じで、G6P を燃料とした電解反応の結果を Figure 3 の inset (b) に示す。この結果、電解開始直後に $Q/FN_{G6P} = 3.5$ に達し、電解 6 h で $Q/FN_{G6P} = 9.6$ にまで達した。酵素 7 の活性量を増加させることにより、初期脱水素酵素(1, 3)の反応速度も増加したように見える。これは、後続反応の促進により、中間体による生成物阻害が低減されたことに起因するのかもしれない。反応時間 0.1~0.7 h では Q/FN_{G6P} は時間にほぼ比例して増加している。これが、この条件での PP 経路の定常的速度を反映していると推察できる。それ以降では、 Q/FN_{G6P} の増加速度が小さくなってきたが、これは酵素活性の低下によると考えた。

結論

本研究では PP 経路を人工的に構築し、DI による NADPH の酸化系を組み込むことにより G6P の電解酸化を行った。構築した PP 経路の酵素群の中で律速段階にある酵素反応の活性を増強することで、G6P 再生反応を向上できることを確認した。G6P を燃料とした 24 電子反応に対して電子回収率 40% ($Q/FN_{G6P} = 9.6$) を達成した。 $m/z = 229$ のイオンに由来する ribose-5-phosphate 及び xylulose-5-phosphate の蓄積も観測されているので、より高速な PP 経路を構築するためには、酵素 7 に加えて酵素 6 の活性の増強も有効であろう。また、多酵素連結系の反応速度を向上するにはリポゾーム等の微小空間での反応が有効であることが示されている^{15, 16} ので、今後、多種酵素および補酵素を扱う場合、それらを含むしたリポゾームの電極固定法の開発も重要な課題となるであろう。

今回の成果は、glucose を燃料とした酵素電池の高容量化の可能性を広げるヒントになると考えられる。現時点ではまだ予備的知見であり、実用的なレベルへの展開には、酵素組成の更なる最適化や酵素の耐久性の向上が必要である。

参考文献

1. K. Kano (supervising editor), *Recent Progress in Biofuel Cells*, CMC Publishing (2011). [in Japanese]
2. Y. Kamitaka, S. Tsujimura, N. Setoyama, T. Kajino, and K. Kano, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **9**, 1793 (2007).
3. K. Watanabe, M. Miyahara, T. Shimoyama, and K. Hashimoto, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **92** (6), 1307 (2011).
4. H. Sakai, T. Nakagawa, Y. Tokita, T. Hatazawa, T. Ikeda, S. Tsujimura, and K. Kano, *Energy Environ. Sci.*, **2** 133 (2009).
5. H. Sakai, T. Nakagawa, H. Mita, H. Kumita, and Y. Tokita, *217th Electrochemical Society Meet. Abstr. - Electrochem. Soc.*, **1001**, 396 (2010).
6. T. Nakagawa and H. Sakai, *Nenryou Denchi*, **10** (3), 12 (2011). [in Japanese]
7. H. Kumita, H. Sakai, Y. Tokita, T. Hatazawa, T. Takahashi, and T. Sugiura, *238th American Chemical Society National Meet., Prepr. Pap.-Am. Chem. Soc. Div. Fuel Chem.*, **54** (2), (2009).
8. K. Murata, S. Fujita, S. Yamanoi, H. Sakai, and Y. Tokita, *221th Electrochemical Society Meet. Abstr.*, **1201**, 1428 (2012).
9. S. Tsujimura, J. Fukuda, O. Shirai, K. Kano, H. Sakai, Y. Tokita, and T. Hatazawa, *Biosens. Bioelectron.*, **34**, 244 (2012).
10. J. Woodward, S. M. Mattingly, M. Danson, D. Hough, N. Ward., and M. Adams, *Nature Biotechnol.*, **14**, 872 (1996).
11. J. Woodward, K. A. Cordray, R. J. Edmonston, M. Blanco-Rivera, S. M. Mattingly, and B. R. Evans, *Energy Fuels*, **14**, 197 (2000).
12. J. Woodward, M. Orr, K. Cordray, and E. Greenbaum, *Nature*, **405**, 1014 (2000).
13. Y.-H. P. Zhang, B. R. Evans, J. R. Mielenz, R. C. Hopkins, M. W. W. Adams, *PLoS ONE*, **2**, e456 (2007).
14. Y. Goto and Y. Tokita, Japan Patent Kokai 2008-303149. [in Japanese]
15. R. Matsumoto, M. Kakuta, Y. Goto, T. Sugiyama, H. Sakai, Y. Tokita, T. Hatazawa, S. Tsujimura, O. Shirai, and K. Kano, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **12**, 13904 (2010).
16. S. Fujita, R. Matsumoto, K. Ogawa, H. Sakai, A. Maesaka, Y. Tokita, S. Tsujimura, O. Shirai, and K. Kano, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **15**, 2650 (2013).

第5章 積層型シート状電極の構築

要旨

第1章から第3章まで述べた積層型厚膜状の酵素 BFC は、体積出力密度は最大で 5 mW cm^{-3} を示すものの、電池体積当りの容量密度 (体積容量密度) は 1 mWh cm^{-3} 、2 電子換算の容量効率 は 13 % と見積もられ、容量特性が低い。この電池の燃料体積効率は 0.29 であり、出力を優先させたために 7 割が発電部という燃料体積効率の悪い構成であった。その際の出力は、glucose 濃度が 0.4 M の時に最大であり、それ以上では逆に低下した。これは、高濃度では粘度の影響が大きくなり、厚膜状電極内へ glucose 及びプロトンが十分に供給できなくなったと推測される。このように、一般的に電池構造設計において、高出力化と高容量化とはトレードオフの関係にあり、高容量化のためには、根本的に電池構造を見直す必要に迫られた。

そこで本章では、さらに、酵素固定化電極の組成から電極作成プロセスまでを変更させた薄膜電極を検討した。電極基板には、物質供給と表面積の向上の両立させるために、規則性のある織物構造を有する炭素繊維材料 (厚さ $320 \mu\text{m}$) を 1 枚用いた。電子メディエータには、負極においては、ANQ の代わりに、より低電位のアントラキノン-2-スルホン酸 (AQ2S, $E^\circ = -0.45 \text{ V vs. Ag|AgCl, pH 7.0}$) を、正極においては、 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ($E^\circ = -0.36 \text{ V vs. Ag|AgCl, pH 7.0}$) の代わりに、より高電位の 2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)(ABTS, $E^\circ = -0.62 \text{ V vs. Ag|AgCl, pH 7.0}$) を用いることで電池電圧の向上をさせた。さらに正負極の固定化条件も適宜変更を加え、特に正極においては、固定化成分を混合させた水溶性インクを電極基板に塗布するプロセスを採用し、薄膜電極を完成させた。この薄膜電極を用い、発電部全体をシート状とすることで燃料体積効率を 2 倍の 0.54 まで向上させた。この積層型シート状酵素 BFC の電流負荷特性評価を行った結果、従来の厚膜状電池と比較して、体積出力密度は 1 mW cm^{-3} と小さくなるものの、体積容量密度が 13 倍の 12.8 mWh cm^{-3} 、2 電子換算の容量変換効率が 2.3 倍の 29.8%、と大幅に増大した。この電池を用いて、小型電子機器の燃料交換を含めたより長時間の駆動を実現した。同時に、正極に raffinose を添加することで燃料使用前の耐久性の大幅な向上を実現した。

緒言

バイオ電池の実用化に向けて、出力、容量、耐久性といった面でいくつかの課題も残されている。これまで、glucose を燃料とした酵素バイオ電池の出力の向上に注力し、電極及び電解溶液についての技術開発を進め⁷、世界に先駆けて、電極投影面積当りで 10 mW cm^{-2} の出力密度を達成した⁸⁻¹⁰。また積層構造にした厚膜状の酵素バイオ電池を試作することで、 100 mW 級の出力で Walkman[®]等の小型電子機器の動作にも成功した⁸⁻¹⁰。

これまでに試作した厚膜状の酵素バイオ電池系では、例えば、電池 (28 cm^3) に 1 回目の glucose 燃料 (0.4 M , 8 cm^3) を注入することで、小型電子機器としての RC カーを連続 1 時間動作させることができた。この電池は、使用開始時には、電池体積当りで最大 5 mW cm^{-3} の出力密度を示した⁸⁻¹⁰。しかし、電池性能は経時的に劣化し、最終的に出力密度は 10 分の 1 以下となり、トータルで発電された容量は 28 mWh と小さな値となった。結果として、体積当りの容量密度は 1 mWh cm^{-3} 、glucose 24 電子完全酸化反応の内、本電池系で利用している 2 電子で換算した際の容量変換効率は 13% と見積られ、容量特性は著しく低くなった。さらに 1 回目の燃料を排出して 2 回目の燃料を注入しても、その性能は初回のものに比べ極めて低いものであった。この厚膜状酵素バイオ電池の燃料体積効率(= 燃料体積 / 電池体積、電池体積 = 燃料体積 + 発電部体積)は 0.29 であり、出力を優先させたために 7 割が発電部という効率の悪い構成であった。その際の出力は、glucose 濃度が 0.4 M の時に最大であり、それ以上では逆に低下した。このような容量特性が低い要因として、詰め込まれた厚膜状の電極内への物質供給が悪くなり、結果的に燃料の容量変換効率の低下、電極内での pH 変化による性能劣化、燃料の低交換性、燃料の高濃度化の限界等を引き起こしたことが挙げられる。このように電池構造設計において、高出力と高容量とは一般的にトレードオフの関係にあるが、実用化を目指すにはこれら電池性能をバランスさせた電池設計・技術開発が必要である。そのためにはまず、電極自体をシート(薄膜)状にする必要がある。我々はこれまで、グリーティングカード用のシート状のバイオ電池を報告した¹¹が、現時点で他の報告例¹²⁻¹⁷を含めて、十分な出力と容量密度を共に実現した例はない。

そこで本研究では、これまでの出力をある程度維持したうえで、容量密度を向上させることを目標として、電極材料の構成・作製プロセスを見直し、積層型シート状酵素バイオ電池 (Figure 1) の構築を検討した。第 1 章から第 3 章までで報告したセル (厚膜状酵素バイオ電池) では、外側から biocathode、bioanode、燃料タンクという順番の電池構造であった⁷が、本研究では、燃料供給の向上を狙い、外側から燃料タンク、bioanode、biocathode という逆の順番にした。また、燃料注入量を増加させることを目的として電極をシート状にして薄膜化した。本論文では、新規な酵素バイオ電池の構成・作製法の詳細と、電流の負荷特性評価からの容量特性の結果と共に、電池の耐久性 (保存、燃料交換、連続使用) について報告する。

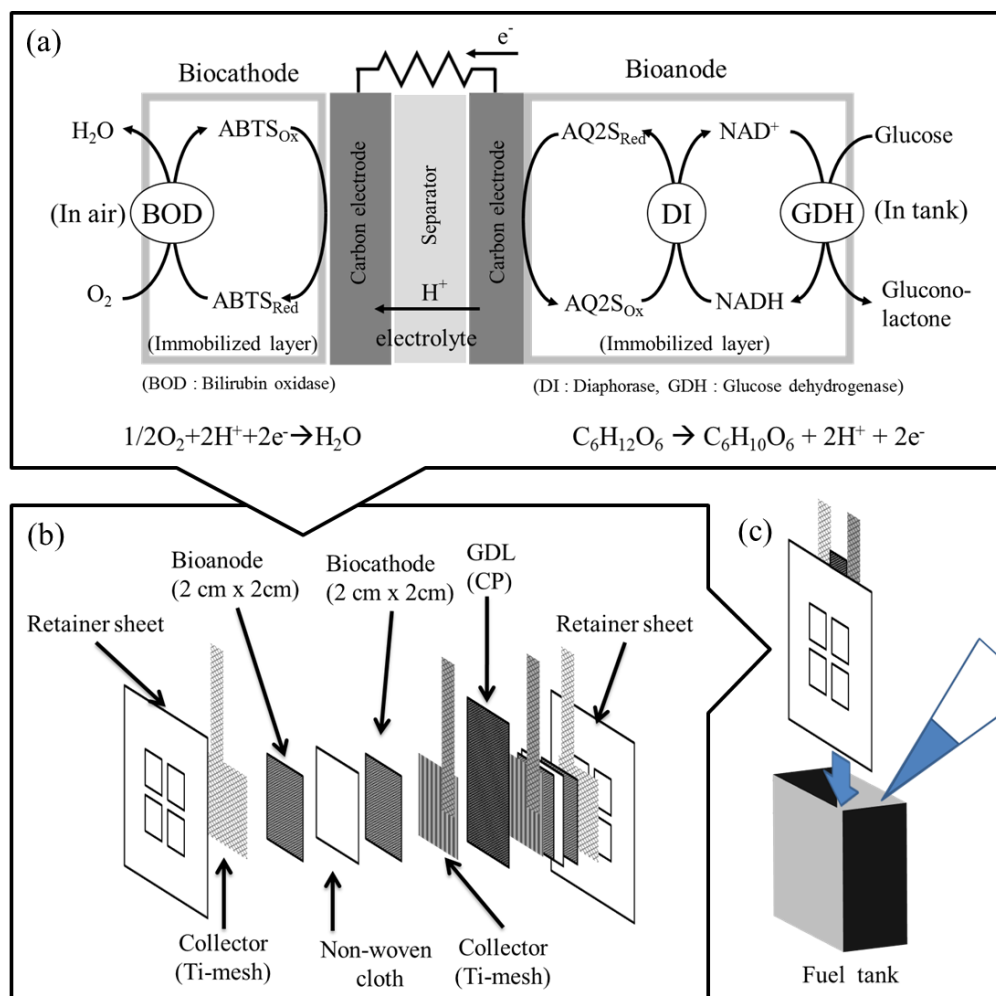


Figure 1 Structure of a multi-stacked biofuel cell unit with a fuel tank.

(a) Pattern diagram of the component materials and reactions in the biofuel cell.

(b) Schematic view of the unit composed of two biofuel cells connected in parallel. The total area of the bioanode or the biocathode in the unit is 8 cm². The thickness is 2.3 mm.

(c) Assembly diagram of the unit and the fuel tank. The total volume is 6.5 cm³. The input volume of fuel (1.2 M glucose in 2 M potassium phosphate buffer (pH 7.5)) is 3.5 cm³.

実験方法

電池構造

Figure 1(a) にメディエータ型酵素バイオ電池の反応模式図を示す。Bioanode では、酵素・補酵素系として、glucose dehydrogenase (GDH)と diaphorase (DI) および NADH を用い、電子メディエータとして anthraquinone-2-sulfonic acid (AQ2S, $E^{\circ} = -0.45$ V vs. Ag|AgCl|KCl (sat.), pH 7)¹⁸ を用いた。GDH 触媒で glucose を NAD^+ により 2 電子酸化し、生成する NADH を DI を触媒として AQ2S で酸化する。そこで生成する還元型 AQ2S を電極上で酸化する。一方、biocathode では、bilirubin oxidase (BOD) を触媒として、2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid) (ABTS, $E^{\circ} = 0.62$ V vs. Ag|AgCl|KCl (sat.), pH 7)¹⁹ を電子メディエータとして用いた。ここでは O_2 を BOD 触媒の下、ABTS で 4 電子還元し、生成する ABTS 酸化体を電極上で還元する。Bioanode と biocathode の作製法は後に詳しく述べる。

Figure 1(b) に簡単な組立図を示す。まず、作製した bioanode と biocathode の間にセパレータとして不織布(厚さ 180 μm)を挟み、その両外側から集電体 Ti メッシュ(厚さ 50 μm)を重ねた。次にこれを 1 対作製し、2 つの biocathode を対向させた。その間にガス拡散層としてカーボンペーパー (CP, 東レ製, 厚さ 200 μm)を集電体 Ti メッシュと一緒に配置した。その両外側から、燃料供給口を設けたプラスチック薄膜フィルム(厚さ 100 μm)の淵をラミネート圧着させることで、積層型シート状酵素バイオ電池ユニットを得た。Bioanode と biocathode の 2 つずつの Ti メッシュを並列接続した。ラミネートする際、CP の上端が外部に露出するようにした。電池ユニットの厚さは 2.3 mm となった。

Figure 1(c)に示すように、作製した積層型シート状酵素バイオ電池ユニットを燃料タンク(体積 6.5 cm^3)に挿入し、燃料として、1.2 M glucose/2 M リン酸緩衝液 (pH 7.5)を 3.5 cm^3 注入した。

試薬

酵素 GDH と DI は東洋紡(株)から、BOD は天野エンザイム(株)から購入した。Glucose, NADH, ABTS はシグマアルドリッチ(株)から、AQ2S は東京化成工業(株)から購入した。酵素固定化用の試薬としての poly-L-lysine (PLL, MW > 300,000)及び glutaraldehyde (GA)はシグマアルドリッチ(株)から購入した。Bioanode で用いる hierarchical porous carbon (HPC)は所定の方法²⁰により、合成・調製した。

Bioanode の作製

電極基材として市販の織物構造を有する炭素繊維材料(厚さ 320 μm)を 2×2 cm 角にカットし UV オゾン処理後使用した。HPC の水懸濁液(HPC, 14.4 mg)、AQ2S の水／アセトン溶液(AQ2S, 16.4 μg)、NADH 水溶液 (NADH, 24.4 mg)、GDH と DI を含むリン酸緩衝液 (GDH, 116 mg; DI 17.4

mg)、PLL 水溶液(PLL, 18 mg)、および GA 水溶液(GA, 113 mg)を記載順に塗布し、その都度 40 °C で乾燥し、bioanode を得た。

Biocathode の作製

電極基材は bioanode と同様のものを用いた。正極インク水溶液は以下の組成で自転・公転ミキサーを用いて、十分に混合して調製した; 0.5 g ketjenblack (KB), 0.5 g vapor-grown carbon fiber (VGCF), 0.2 g carboxymethylcellulose (CMC), 0.4 g ABTS, 0.6 g BOD, 1.0 g raffinose, および 12 cm³ H₂O。この正極インク水溶液を電極基材に両面塗布後、40 °C で乾燥した。最後に撥水材として polytetrafluoroethylene (PTFE)を含む溶液を適量塗布・乾燥後、2×2 cm 角にカットして biocathode を得た (インク乾燥重量 10 mg cm⁻²)。

電流負荷特性評価

電気化学測定は、1480 Multi-Stat (Solartron 社製)を用いて、bioanode 側の Ti メッシュを作用極に、biocathode 側の Ti メッシュを対極に接続して、2 極式で常温・常圧・静止系で、電流負荷特性評価 (4, 6, 8, 10, 12 mA)を行った。電圧が 0.4 V となった時点で測定を中止した。

結果及び考察

発電の仕組み

この酵素バイオ電池の発電の仕組みは、Figure 1(a)に示すとおりである。Bioanode では、NAD 依存性の GDH が触媒となり glucose を 2 電子酸化し、gluconolactone を生じる。この反応の電子受容体である NAD^+ は NADH に還元される。NADH:quinone oxidoreductase の一種である DI を触媒として、NADH を AQ2S で酸化する。生成する AQ2S の還元体が、電極反応により電子とプロトンを放出する。プロトンは電解質を介してセパレータを透過して biocathode 側に移動する。Biocathode では、BOD が触媒となって、電極から電子を受け取った還元型 ABTS とプロトンを用いて、酸素を 4 電子還元して水を生成する。この一連の電気化学反応の中で、電子が bioanode から外部回路を介して biocathode 側に流れる過程で電力が得られる。作動電位を増加させるために、負極メディエータとして E° が非常に負である AQ2S を、また正極メディエータ E° が非常に正である ABTS を選択したことがひとつの特徴である。

Bioanode の特徴

Bioanode 側では、多孔質炭素材料 HPC の細孔内に固定化成分; GDH, DI, NAD^+ , AQ2S を効率的に取り込むことで、多くの固定化成分の測定溶液中への溶出を抑え、特に燃料交換に伴う性能を維持できることがわかった^{21,22}。また、従来は電極基材として用いていたカーボンフェルト (CF) は炭素繊維がランダムな方向性を持ったものであったが、今回の基材は、10 μm 程度の炭素繊維が 100 μm 程度の束になった織物構造を有している。このことにより、電極垂直方向及び水平方向への物質供給経路を多くし、実効的な電極表面積を増加した。

Biocathode の特徴

Biocathode 側では、炭素材料としての KB と VGCF を主成分とし、CMC をバインダーとした水溶性インク、および撥水材料を用いたことで、これまで困難であった ABTS の安定な保持と空気拡散型電極特性の発現を同時に達成できた²³。上述した条件で作製した biocathode の単極評価で、空気中のパッシブモードの下、面積電流密度 1 mA cm^{-2} の負荷で、0.2 V (vs. Ag|AgCl) 以上の電位を少なくとも 100 h 持続することに成功した。また raffinose を添加することで、燃料注入前の長期保存性を大幅に向上できることがわかった^{24,25}。さらに電池構造として、Figure 1(b), (c)に示すように、ガス拡散層 CP の上端を集電体の間から電池外部に露出させることで、水没させずに外部からの空気を効率的に取り込むことができた。

電池の構造

既報の厚膜型酵素バイオ電池では、2 つの bioanode をその内側に燃料タンクを保持し対向するように並列接続し、その両外側に 2 つの biocathode を配置し並列接続したタイプであり、さらにその外側から 2 枚の固定板により圧縮される構造であった⁷。高出力化を狙うために、両極とも CF 電極基材を数枚重ねたことで厚くなり結果的に発電部が大きくなった(燃料/電池体積比 = 0.29)。

本研究では、Figure 1(b)に示すように内側に biocathode を、その外側に bioanode を配置し、薄膜化したシート状 (厚さ 2.3 mm)のユニットを燃料タンクに挿入した構造になっている (Figure 1(c))。これにより、大きな電極面積 ($2 \times 2 \text{ cm}^2 \times 2 \text{ 枚} = 8 \text{ cm}^2$)を有するユニットを挿入しても、燃料タンク内に、大きな燃料容積 (3.5 cm^3)を確保できるようになった。その結果、燃料タンクを含めた今回の電池 (6.5 cm^3)は、従来の電池構造と比較して約 2 倍の、燃料/電池体積比 = 0.54 を実現できた。

電流負荷特性評価

この積層型シート状バイオ電池ユニットを用いて、電流負荷特性を評価した。このユニットが入った燃料タンクには、燃料として 2 M リン酸緩衝液 (pH 7.5)に溶かした 1.2 M glucose 溶液を 3.5 cm^3 注入した。今回の電池に用いた燃料組成は、出力/容量/耐久性のバランスで最適化して決定したが、特に燃料濃度は従来のものと比較して 3 倍濃いものとした。これは、①上述した織物構造を有する炭素繊維電極を用いたこと、及び②2 倍の燃料/電池体積比の構造を用いたことによって、粘度の高い高濃度 glucose 燃料であっても、性能を損なうことなく電極表面に供給され易くなり、効率的に電力に変換できたためと考えている。

燃料注入した電池を電気化学測定装置に接続し開回路電圧が 1 V となった時点で、それぞれの電池に電流負荷 (4, 6, 8, 10, 12 mA)をかけて測定を開始した。その結果を Figure 2 に示す。測定開始後、0.9 V まで電圧が降下したが、いずれの場合も正味の発電を観測できた。ただし、10 mA 及び 12 mA の条件では測定開始 1 h 未滿でカットオフ電圧 0.4 V に達した。4, 6, 8 mA の条件では、電流が小さい順に発電時間は長くなり、発電電位も高くなった。4 mA では、平均電位 0.84 V、発電時間 27.3 h を示した。

これらの結果をもとに、体積容量密度及び変換効率を計算したものを Table 1 にまとめる。4, 6, 8 mA の glucose からの 2 電子換算のクーロン変換効率は 45 %以上となり、燃料である glucose の約半分が酵素電極反応に用いられたと考えられる。測定後の溶液中の glucose 濃度を、glucose センサーを用いて測定した結果ともよく対応した (結果非開示)。また 4, 6, 8 mA の実験条件を面積電流密度に換算すると、それぞれ 0.5, 0.75, 1 mA cm^{-2} となる。上述した biocathode の性能 (1 mA cm^{-2} で 100 h)を考慮すると、4, 6, 8 mA で 0.4 V に電圧降下して発電ストップする要因は、bioanode 側の性能低下、つまり発電により glucose 燃料濃度が低下したことから推定される。これを裏付ける結果として、測定後に 1 回目の燃料を廃棄して 2 回目の燃料を注入することで、1 回目と同様に発電することができた^{21,22}。一方、10 mA (1.25 mA cm^{-2})及び 12 mA (1.5 mA cm^{-2})では、どちらの電極が律速となったのかは不明であるが、印加電流に対応できずに電圧が降下し発電がスト

ップした。その際、2 電子換算で glucose を 5 %以下しか利用できていないことが分かる。

続いて電池体積当りの容量密度を計算すると、4 mA の場合で最大の 14.1 mWh cm^{-3} を示した。ただし、電池体積当りの平均出力密度が 0.5 mW cm^{-3} と小さくなった。電池性能のバランスという観点では、8 mA の場合の方が優れた性能を示し、体積容量密度 12.8 mWh cm^{-3} および体積出力密度 1.0 mW cm^{-3} が得られた。この時の容量変換効率は 29.8%に相当する。これらの値は、従来の電池性能と比較すると、体積出力密度では 1/5 であるが、体積容量密度で 13 倍、容量変換効率が 2.3 倍に相当する。

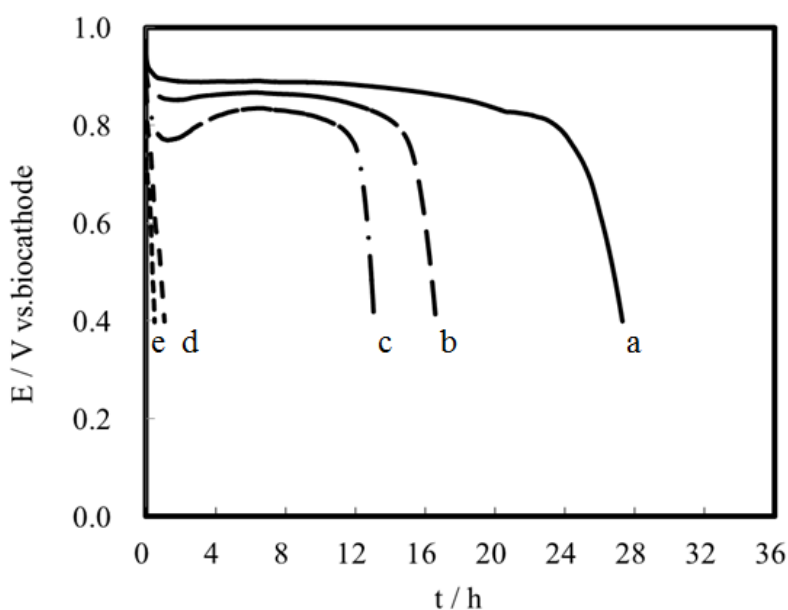


Figure 2 Time course of galvanostatic polarization for the multi-stacked biofuel cell unit. Curves (a) ————, (b) — — — —, (c) — · — —, (d) — — — —, and (e) — — — — show the data at constant current values of 4 mA, 6 mA, 8 mA, 10 mA, and 12 mA, respectively.

Table 1 Cell performance evaluated from the data given in Figure 2.

Current / mA	Operating Time* / h	Coulomb / C	Coulomb efficiency** / %	Energy / mWh	Energy efficiency** / %	Energy density / mWh cm^{-3}	Ave. power density / mW cm^{-3}
4	27.3	392.8	48.5	91.8	32.9	14.1	0.5
6	16.6	358.6	44.3	82.6	29.6	12.7	0.8
8	13.1	376.2	46.5	83.1	29.8	12.8	1.0
10	1.1	38.4	4.7	6.6	2.4	1.0	1.0
12	0.5	21.5	2.7	3.6	1.3	0.6	1.1

*: time to reach into 0.4 V of the cell voltage

**: calculation for theoretical value in terms of 2-electron reaction

保存に関する耐久性評価

生体材料を用いるバイオ電池は、一般的に熱に対する耐久性が低い。これはタンパク質である酵素の熱変性により活性が低下するためである。我々の系 (Figure 1(a))の中で、特に正極酵素 BOD の熱安定性が問題であった。これを解決する手段の一つとして、遺伝子工学を用いた耐熱性 BOD の開発を行い、biocathode の保存性能の向上に関する成果を報告してきた²⁶。ここでは、酵素 BOD 固定化膜中に糖類を添加することで biocathode の保存性能を向上させた結果について説明する。上述した biocathode の作製プロセスにおいて、raffinose を含め各種糖類を添加した電極を高温条件 (乾燥, 80 °C)下で保存し、保存時間に対する触媒電流値の変化を評価した。結果を Figure 3 に示す。糖類を添加していない電極 (control)は 1 日で触媒電流値がほぼゼロになった。一方糖類を添加したものは、触媒電流値の低下が抑制され、5 日後の触媒電流値の維持率は、raffinose 及び trehalose は 30%、maltose は 60 %と大幅に向上した。この糖類による安定化の理由としては、保存対象物の周囲に糖類が高粘度のガラス状態を形成することで、物理的・化学的・生物学的変化が容易に起こらないためと説明されており²⁷、一般に構成する単糖の数が増えると (分子量が増えると)ガラス転移温度も高くなり、室温における安定性も向上する。最終的には、これら糖類を添加した正極を用いてバイオ電池を作製し、バイオ電池全体の保存耐久性が高くなっていることを確認した上で、出力的に最も高性能であった raffinose を採用した。

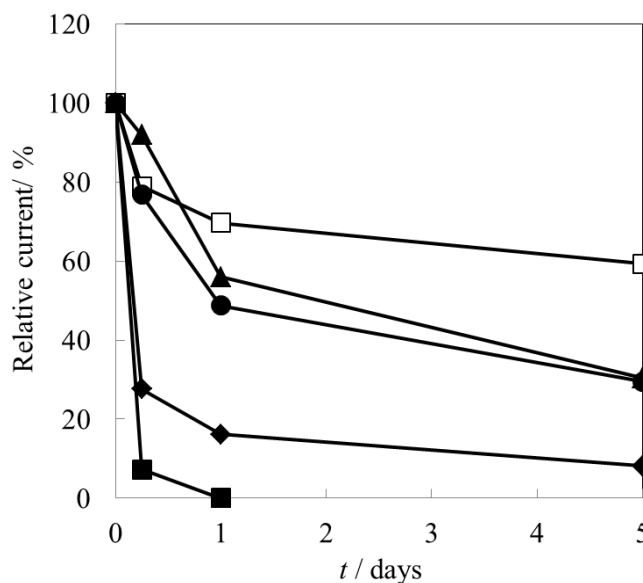


Figure 3 Durability evaluation for stability of the biocathode containing a sugar group under dry condition at 80 °C.

■; control, ◆; sucrose, ●; raffinose, ▲; trehalose, □; maltose.

燃料交換・連続使用に関する耐久性評価

バイオ電池は水に溶解した glucose が燃料となるため、発電に従って燃料溶液の体積は変わらず、glucose の濃度が低下する。再び発電するためには、燃料溶液自体の「交換」が必要である。この際、問題であったのが、電極に固定化してあった酵素や電子メディエータの溶出である。特に、燃料溶液に接している bioanode の電子メディエータの溶出の影響は大きく、燃料溶液の交換時のみならず、連続使用時の耐久性に対しても問題であった。そこで我々は、電子メディエータは従来のものを使用し、それを吸着させる側の炭素電極材料に注目した。多種類の多孔質炭素材料を用いて電極を作製し、その性能を評価した。その結果、最も良い性能を示したのが、階層的な細孔分布を持つ HPC であった²⁰。これは稲の籾殻を焼成するなどして作製した多孔質の炭素材料であり、マイクロ孔 (0.1–2 nm)、メソ孔 (2–50 nm) が階層的 (hierarchical) に形成されている。これを用いることで、電子メディエータがこれら細孔内に取り込まれ^{21,22}、これまで 1 回目の燃料交換で電子メディエータの大半が溶出していたものが大幅に抑制され、2 回目以降の燃料交換においても性能が維持される系を達成できた。

この技術を導入している上述の積層型シート電池をさらに 3 直列 5 並列に接続することでさらに高性能にした電池系を、既存電池を取り外したソニー製ラジオ (ICF-B03) に接続し、ラジオの標準動作 (40 mW, 1.6 V カットオフ) の確認と共に燃料交換・連続使用の耐久性評価を行った。結果を Figure 4 に示す。1 回目の燃料における電池の体積容量密度も上述した性能と同程度であった。また 2 回目の燃料交換以降において徐々に出力低下が見られるが、連続使用 100 h 程度の十分な時間動作することが確認できた。

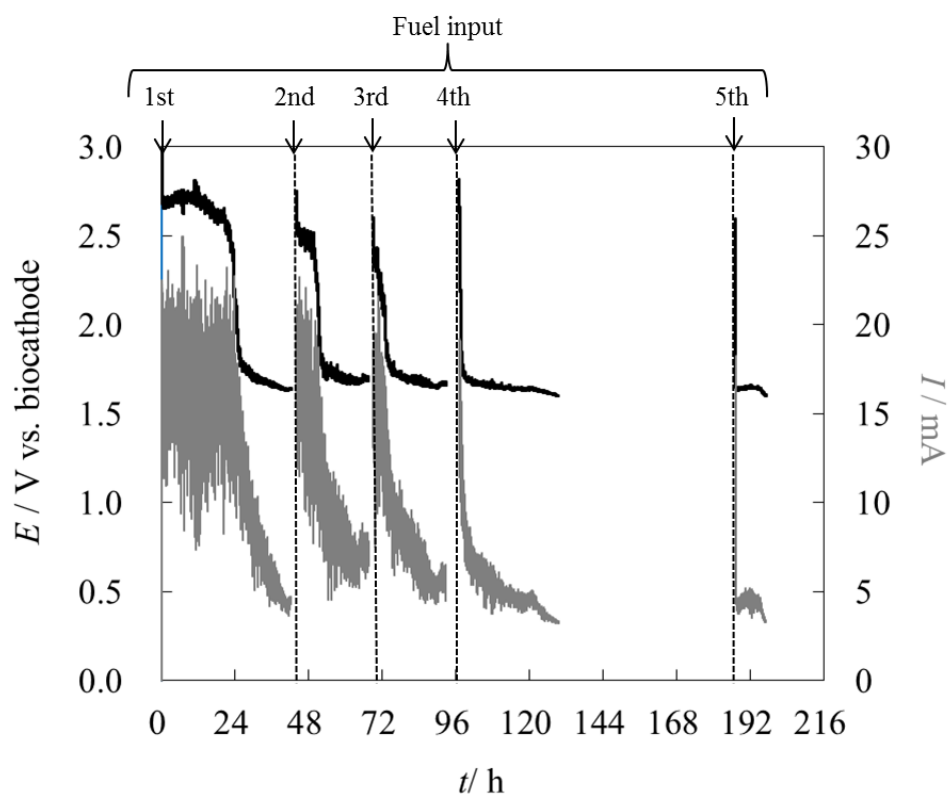


Figure 4 The continuous operating test of a radio (Sony, ICF-B03) powered by 15 multi-stacked biofuel cell units connected in 5 parallel and 3 series. Black line is voltage (left y-axis), gray line is current (right y-axis). The total volume of the 15 units is 66 cm³. The input volume of fuel (1.2 M glucose in 2 M potassium phosphate buffer (pH 7.5)) is 36 cm³.

結論

今回、容量向上のために、燃料容積効率及び燃料供給能が優れた積層型シート状バイオ電池を設計し、その電池特性評価を行った。その結果、従来の電池と比較して、体積出力密度は多少低下したが、体積容量密度と容量変換効率は従来に比べて大幅に向上させることに成功した。さらに今回の電池は、燃料交換による電池性能の低下の問題を大幅に改善できた上、使用前の長期保存性能を大幅に向上することに成功した。さらにこの電池は直列・並列接続の設計自由度が高く、実際に非常用ラジオ等の燃料交換の実動作も確認している。

ただし、現在市販されている一次電池等の実用電池の体積容量密度は、最低でも 100 Wh cm^{-3} は必要であり、さらなる高容量化が必要であると同時に低コスト化も重要である。

今後電池構造・材料の最適化、燃料の高濃度化、燃料の完全酸化に向けた複合酵素反応の導入、を検討することで、さらなる高容量化のチャレンジが必要である。

参考文献

1. S. C. Barton, J. Gallaway, and P. Atanasov, *Chem. Rev.*, **104**, 4867 (2004).
2. N. Mano, F. Mao, and A. Heller, *ChemBioChem*, **5**, 1703 (2004).
3. J. A. Cracknell, K. A. Vincent, and F. A. Armstrong, *Chem. Rev.*, **108**, 2439 (2008).
4. M. J. Moehlenbrock and S. D. Minteer, *Chem. Soc. Rev.*, **37**, 1188 (2008).
5. D. Leech, P. Kavanagha, and W. Schuhmannb, *Electrochim. Acta*, **84**, 223 (2012).
6. K. Kano (supervising editor), *Recent Progress in Biofuel Cells*, CMC Publishing (2011). [in Japanese]
7. H. Sakai, T. Nakagawa, Y. Tokita, T. Hatazawa, T. Ikeda, S. Tsujimura, and K. Kano, *Energy Environ. Sci.*, **2** 133 (2009).
8. H. Sakai, T. Nakagawa, H. Mita, H. Kumita, and Y. Tokita, *217th Electrochemical Society Meet. Abstr. - Electrochem. Soc.*, **1001**, 396 (2010).
9. T. Nakagawa and H. Sakai, *Nenryou Denchi*, **10 (3)**, 12 (2011). [in Japanese]
10. T. Nakagawa, H. Mita, H. Kumita, H. Sakai, Y. Tokita, and S. Tsujimura, *Electrochem. Commun.*, **36**, 46 (2013).
11. <http://www.sony.co.jp/SonyInfo/News/Press/201112/11-1205/index.html>. [in Japanese]
12. T. Miyake, S. Yoshino, T. Yamada, K. Hata, and M. Nishizawa, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 5129 (2011).
13. G. P. M. K. Ciniciatoa, C. Laua, A. Cochran, S. S. Sibbett, E. R. Gonzalez, and P. Atanasov, *Electrochim. Acta*, **82**, 208 (2012).
14. L. Zhang, M. Zhou, D. Wen, L. Bai, B. Lou, and S. Dong, *Biosens. Bioelectron.*, **35**, 155 (2012).
15. X. E. Wu, Y. Z. Guo, M. Y. Chen, and X. D. Chen, *Electrochim. Acta*, **98**, 20 (2013).
16. P. Jenkins, S. Tuurala, A. Vaari, M. Valkiainen, M. Smolander, and D. Leech, *Enzyme Microb. Technol.*, **50**, 181 (2012).
17. I. Shitanda, S. Kato, Y. Hoshi, M. Itagaki, and S. Tsujimura, *Chem. Comm.*, **49**, 11110 (2013).
18. K. Kano, *Rev. Polarog.*, **48**, 29 (2002).
19. S. Tsujimura, H. Tatsumi, J. Ogawa, S. Shimizu, K. Kano, and T. Ikeda, *J. Electroanal. Chem.*, **496**, 69 (2001).
20. S. Tabata, H. Iida, T. Horie, and S. Yamada, *Med. Chem. Commun.*, **1**, 136 (2010).
21. K. Murata, S. Fujita, S. Yamanoi, H. Sakai, and Y. Tokita, *221th Electrochemical Society Meet. Abstr.*, **1201**, 1428 (2012).
22. S. Fujita, S. Yamanoi, K. Murata, H. Mita, T. Samukawa, T. Nakagawa, H. Sakai, and Y. Tokita, to be submitted.
23. T. Nakagawa, K. Murata, T. Samukawa, S. Fujita, H. Mita, and H. Takada, PCT International Application WO2013/065581.
24. T. Samukawa, T. Sugiyama, H. Kumita, D. Yamaguchi, T. Nakagawa, H. Sakai, and Y. Tokita, *221th Electrochemical Society Meet. Abstr.*, **1201**, 1455 (2012).
25. H. Kumita, and H. Sakai, *Material Stage*, **12 (12)**, 76 (2013). [in Japanese]
26. H. Kumita, H. Sakai, Y. Tokita, T. Hatazawa, T. Takahashi, and T. Sugiura, *238th American Chemical*

- Society National Meet.*, Washington, D.C., *Fuel*, **272** (2009).
27. F. Franks, and M. Terashima, *Protein, Nucleic Acid and Enzyme*, **41**, 810 (1996). [in Japanese]

結言

本研究では、将来のグローバルな環境・エネルギーの問題を解決することを最終目的に、生体システムを応用したメディエータ型酵素バイオ電池の実用化を目標とした要素技術、特に出力、容量に関わる研究開発を行った。高出力化については、律速段階を見極めながら、酵素固定化電極、電解液、メディエータに対して複合的に研究開発を進めた。高容量化については、複合酵素反応の基礎評価から、作製プロセス開発を含む電池構造の検討まで、幅広く研究開発を進めた。

以下に、本論文で述べた結果を総括する。

第1章

酸素拡散型正極を導入することにより、大気中の酸素の効率的な取り込みが可能となり、大きな還元触媒電流が得られた。

電解液に含まれる緩衝物質を高濃度にするにより、発電に伴う電極内の pH 変化を抑制できることを明らかにし、酵素の活性低下の抑制による触媒電流値の増大を実現した。

第2章

負極用電子メディエータをコンピュータシミュレーションで設計することで、高い動作電位を示す高出力な電池系を構築した

第3章

第1及び2章をまとめることで、厚膜状酵素バイオ電池の面積出力密度; 5 mW cm^{-2} (at 0.5 V) を達成した(最終的に、面積出力密度; 10 mW cm^{-2} 、体積出力密度; 5 mW cm^{-3} 、を達成)。

第4章

生体内の PP 回路を *in vitro* で再構成し、酵素群の中で律速となる酵素活性を増強することで、効率よく燃料が分解させることを示した。G6P を燃料とした 24 電子反応に対する電子回収率 40% (9.6 電子に相当)を達成した。

第5章

シート状酵素バイオ電池を新たに設計することで、体積出力密度; 1 mW cm^{-3} 、体積容量密度; 12.8 mWh cm^{-3} 、2 電子換算の容量変換効率; 29.8 %、の高い容量特性、及び耐久性(保存、連続使用、燃料交換)の向上、を実現した。

謝辞

本研究は、酒井がソニー株式会社に在籍中、京都大学大学院 農学研究科 応用生命科学専攻 生体機能化学研究室(現 加納 健司研究室、旧 池田 篤治研究室)への2001年の受託研究に始まり、2007年から2012年までの同研究室との共同研究を進める中で、実施されたものである。

本研究をまとめるにあたり、多大なるご指導、ご鞭撻を賜ると共に、研究の楽しさと厳しさをご教授頂いた、京都大学大学院 農学研究科 応用生命科学専攻 生体機能化学研究室 加納 健司教授に心から感謝いたします。また長期間に渡った本研究を行う機会を与えて頂きました、ソニー株式会社 元研究所所長 西 美緒氏、及び、熊谷 修氏、並びに、元部長 畠沢 剛信氏、にお礼致します。

本研究を進めるにあたり、ソニー株式会社で本プロジェクトにご助言、ご協力を賜った、すべての社員の方々、また酵素や電極材料の開発、受託分析において多大なるご協力を頂いた社外の担当者の皆様、さらに加納研究室との共同研究を進める中で特に密接にご指導頂きました、白井 理博士(同研究室、准教授)、及び、辻村 清也博士(現 筑波大学大学院数理物質科学研究科 物性・分子工学専攻生物電気化学研究室、准教授)、に敬意を表します。

最後に、今日にいたるまで支援してくれた家族に深甚なる感謝の意を表します。

発表論文

第 1 章

A high-power glucose/oxygen biofuel cell operating under quiescent conditions

Energy Environ. Sci., **2**, 133-138 (2009)

H. Sakai, T. Nakagawa, Y. Tokita, T. Hatazawa, T. Ikeda, S. Tsujimura, K. Kano

第 2 章

Sony's biofuel cell

ECS Trans., **13** (21), 89-97 (2008)

Y. Tokita, T. Nakagawa, H. Sakai, T. Sugiyama, R. Matsumoto, T. Hatazawa

第 3 章

A high-power glucose/oxygen biofuel cell operating under quiescent conditions

ECS Trans., **16** (38) 9-15 (2009)

H. Sakai, T. Nakagawa, H. Mita, R. Matsumoto, T. Sugiyama, H. Kumita, Y. Tokita, T. Hatazawa

第 4 章

酵素電極触媒型 NADPH 酸化反応を共役したペントースリン酸回路の再構成

Electrochemistry, **81(12)**, 981-984 (2013)

酒井秀樹, 戸木田裕一, 辻村清也, 白井 理, 加納健司

第 5 章

積層型シート状酵素バイオ電池の構築

Electrochemistry (submitted on 2013/11/12)

酒井秀樹, 三田洋樹, 杉山太喜, 戸木田裕一, 白井 理, 加納健司